

EXTRACÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS HETEROCICLICAS EM CARNE POR HPLC: EFEITO DA ADIÇÃO DE INGREDIENTES RICOS EM ANTIOXIDANTES

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia
Da Universidade do Porto para obtenção do grau
de Mestre em Controlo de Qualidade na área da
Especialidade Água e Alimentos.

Trabalho realizado no Laboratório de
Bromatologia da Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto

Sob orientação de:

Prof^a Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira

Co-orientação de

Prof^a Doutora Olívia Maria de Castro Pinho

RESUMO

No âmbito desta dissertação quantificaram-se as aminas aromáticas heterocíclicas (HAAs) em carne cozinhada em condições normais e avaliou-se o efeito da adição de ingredientes ricos em antioxidantes.

Efectuou-se um estudo comparativo de três métodos de extracção e purificação descritos na literatura., dois métodos (o de Gross modificado e o de Toribio) recorrendo a extracção líquido-líquido associada a extracção em fase sólida e o outro por microextracção em fase sólida. O método de Gross foi o seleccionado, pois embora mais moroso e dispendioso, envolve menos perdas e permite a obtenção de percentagens de recuperação mais elevadas.

Na análise dos pratos de carne tradicionalmente consumidos em Portugal (carne frita, grelhada e assada no forno) verificou-se que as HAAs apenas eram quantificáveis para um nível de cocção “bem passado”. A carne assada no forno apresentou um perfil diferente de HAAs, comparativamente com as amostras de carne frita e grelhada. Nas amostras de carne assada não foram detectadas HAAs do tipo IQ e apresentaram uma maior quantidade de HAAs apolares (Me α C, Trp-P-1 e Trp-P-2). Por outro lado, as amostras de carne frita e grelhada apresentaram maior teor de PhIP, MeIQx e IQ. A adição de ingredientes normalmente utilizados na Gastronomia Portuguesa, como o sal, o alho, o vinho, o tomate, a cebola e o azeite não reduziu significativamente a formação de HAAs nestes pratos ($p < 0.05$).

Nos ensaios de avaliação da influência da marinada de vinho e de cerveja na composição em HAAs, foram quantificadas quatro HAAs, a MeIQx, a 4,8-DiMeIQx, a PhIP e a A α C, tanto nas amostras de carne grelhada não marinada como nas amostras de carne marinada. A Trp-P-1, a Trp-P-2 e a MeA α C foram identificadas, mas abaixo do limite de quantificação, as restantes 7 HAAs não foram identificadas. As marinadas de vinho e de cerveja mostraram ter um efeito redutor na formação das HAAs. Em geral, não se verificaram diferenças significativas no teor de HAAs para as duas marinadas. No entanto, para tempos de marinada mais curtos a cerveja revelou-se mais eficiente na redução das HAAs que o vinho. Adicionalmente, a marinada de cerveja não influenciou as características de aparência e sabor do bife grelhado.

ABSTRACT

In this work quantification of the heterocyclic aromatic amines (HAAs) was performed in coked meat under normal conditions and the affect of adding ingredients rich in antioxidants was evaluated.

A comparative study of three extraction and purification methods in the literature was carried out. Two methods (the Gross modified method and Toribio method) using liquid-liquid extraction associated with the solid phase extraction and the other method by microextraction in solid phase. The Gross method was selected, because although more time consuming and costly, involves minor losses and enables the achievement of higher recovery percentages.

Analysis of meat dishes traditionally consumed in Portugal (fried meat, grilled meat and oven cooked meat) revealed that the HAAs were only quantified in a cooking level of “well done”. The oven cooked meat presented a different profile of HAAs, compared with the samples of fried and grilled meat. HAAs of IQ type were not detected in oven cooked meat samples and a greater amount of non-polar HAAs (Me α C, Trp-P-1 and Trp-P-2) were found in this samples. In addition, samples of fried and grilled meat showed higher levels of PhIP, MeIQx and IQ. The addition of ingredients commonly used in Portuguese Gastronomy, such as salt, garlic, wine, tomatoes, onion and olive oil didnot reduced significantly the formation of HAAs in these dishes (p <0.05).

The assays for evaluation the influence of wine marinade and beer in the composition of HAAs indicated that four (MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP and A α C) were quantified in both samples, grilled beef not marinated and samples of marinated meat. The Trp-P-1, Trp-P-2 and MeA α C were identified, but below the limit of quantification, the remaining 7 HAAs were not identified. The marinated in wine and beer showed a reduction in the formation of HAAs. In general, there were no significant differences in levels of HAAs for the two marinades. However, for shorter periods of marinating the beer has proved most effective in reducing HAAs that wine. Additionally, the marinade of beer did not influence the characteristics of appearance and flavour of grilled steak.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não representa apenas o resultado de extensas horas de estudo, trabalho e reflexão durante as diversas etapas que a constituem. Não só adquiri vasta experiência técnica e profissional, como também tive oportunidade de conhecer pessoas que conquistaram a minha admiração e me transmitiram os seus conhecimentos, tratando-me com respeito e amizade. É igualmente o culminar de um objectivo académico a que me propus e que não seria possível sem a ajuda de um número considerável de pessoas.

Um agradecimento especial Sr.^a. Professora Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira por todos os conhecimentos transmitidos, sábias orientações, e por todos os momentos em que soube escutar e tentar solucionar os diversos problemas.

À Sr.^a. Professora Doutora Olívia Maria de Castro Pinho pelos seus sábios conselhos, recomendações e contagioso entusiasmo, sempre precioso nas horas difíceis.

À Sr.^a Eng.^a Maria Elisa Amorim de Matos Fernandes Soares pela valiosa paciência, correcção e compreensão, bem como a sua sempre presente palavra amiga.

Aos meus pais, por incutirem o amor ao estudo e à realização profissional, nunca deixando de me apoiar sempre que mais precisei, bem como outros valores que regem a minha vida e me tornaram na pessoa que hoje sou. À minha família, pela sua tolerância, compreensão e carinho.

Estou em dívida para com muitas pessoas, pela sua ajuda, apoio e paciência. Estarão sempre no meu coração! E é por isso que quero dedicar esta Tese a todos aqueles que, sem reservas, partilharam comigo conhecimentos e ombros amigos que sempre precisei.

ÍNDICE

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE DE TABELAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	XII
INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	1
1 – AMINAS AROMÁTICAS HETEROCÍCLICAS (HAAs).....	4
1.1 – Formação	9
1.2 – Metabolismo	11
1.3 – Toxicidade	14
1.4 – Exposição	18
1.5 – Redução dos níveis de exposição às HAAs.....	24
1.6 – Interação entre HAAs e antioxidantes	28
1.7 – Extração das HAAs e purificação dos extractos.....	30
1.8 – Separação e quantificação das HAAs	35
2 – MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1 – Padrões e reagentes.....	43
2.2 – Amostragem	45
2.2.1 – Pratos de carne preparados de acordo com as condições normais de confeção culinária (assar no forno, grelhar e fritar) em casa, a dois níveis diferentes “mal ou bem passado”.	45
2.2.2 – Bifes marinados (cerveja e vinho) e grelhados ao nível “bem passado”	46
2.3 - Extração e purificação	48
2.3.1 – Extração e purificação por SPE com obtenção de duas fracções – Método modificado de Gross.....	48
2.3.2 – Extração e purificação por SPE com obtenção de um único extracto – Método de Toribio	50
2.3.3 – Extração e purificação por Micro Extração em Fase Sólida (SPME).....	52
2.4 - Cromatografia Líquida de Alta Resolução.....	54
2.4.1 – Equipamento	54
2.4.2 – Quantificação das HAAs	55
2.5 – Testes sensoriais	55
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1 – Separação e quantificação das HAAs por HPLC/DAD.....	57
3.1.1 - Validação do método de HPLC/Díodos	57
3.1.2 - Extração das HAAs: Comparação de dois métodos de SPE	60
3.1.3 – Extração e quantificação de HAAs em pratos de carne tradicionalmente consumidos em portugal.	63
3.2. – Separação e quantificação das HAAs por HPLC/DAD/FLD.....	66
3.2.1 – Avaliação da influência da marinada de vinho e de cerveja na composição em HAAs e nas características sensoriais de bife grelhado.....	67
3.3 – SPME-HPLC/DAD/FLD das HAAs apolares e da PhIP	76
4 – CONCLUSÕES	80
5 – BIBLIOGRAFIA.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Abreviaturas e nomes químicos das principais HAAs (adaptado de Alaejos <i>et al</i> , 2008).....	7
Tabela 1.2: Mutagenicidade das HAAs, calculada através do teste de Ames, na <i>S. typhimurium</i> TA98 e TA100 (adaptado de Sugimura <i>et al</i> , 2004).....	15
Tabela 1.3: Mutagenicidade de diferentes compostos, determinada e calculada através do teste de Ames, na <i>S. typhimurium</i> TA100 (adaptado de Sugimura, 1997).....	16
Tabela 1.4: Carcinogenicidade de diferentes HAAs em ratos e ratinhos (adaptado de Sugimura <i>et al</i> , 2004)	17
Tabela 1.5: Quantidade de HAAs em alimentos cozinhados (adaptado de Sugimura <i>et al</i> , 2004).....	20
Tabela 1.6: Consumo diário de HAAs (adaptado de Sugimura, <i>et al</i> , 2004).....	24
Tabela 1.7: Métodos de identificação e quantificação das HAAs (adaptado de Skog, 2002).....	41
Tabela 2.1: Gradiente linear de separação cromatográfica das HAs.....	54
Tabela 3.1: Parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção, avaliados pelo método do padrão externo, para λ de 263 nm.	58
Tabela 3.2: Repetibilidade e reprodutibilidade do método de HPLC avaliada com soluções padrão.	59
Tabela 3.3: Recuperação (%) das HAs em amostras de carne fortificadas usando o método de Gross modificado (Santos <i>et al</i> 2004) e o método de Toribio <i>et al</i> (2007).	61
Tabela 3.4: Parâmetros para os limites de detecção e quantificação das HAAs nos padrões e extractos de carne.	63
Tabela 3.5: Teores de HAAs em carne cozinhada em condições usuais (ng/g carne cozinhada).....	64
Tabela 3.6: Parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção, avaliados pelo método do padrão externo, para λ de 307 nm de excitação e de emissão de 370 nm.	66
Tabela 3.7: Parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção, avaliados pelo método do padrão externo, para λ de 307 nm de excitação e de emissão de 370 nm.	77

Tabela 3.8: Concentração (ng/g) das HAAs apolares e PhIP em carne grelhada, extraídas por SPME e SPE	79
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estruturas químicas das principais HAAs (adaptado de Alaejos <i>et al</i> , 2008).	5
Figura 1.2: Esquema de formação das HAAs e possível local para interferência com os antioxidantes (adaptado de Vitaglione e Fogliano, 2004).	10
Figura 1.3: Principais vias do metabolismo das HACs em modelos animais e humanos (adaptado de Turesky, 2005).	12
Figura 1.4: Mecanismo de toxicidade e destoxificação dos metabolitos N-hidroxil-HCA (adaptado de Turesky, 2005).	13
Figura 1.5: Esquema dos métodos utilizados para avaliação da estimativa de HAAs ingeridas numa dieta normal (adaptado de Sinha, 2002).	19
Figura 1.6: Esquema representativo do estudo multidisciplinar usado para investigar a relação dos diferentes tipos de carcinomas, a dieta individual e as diferentes práticas culinárias (adaptado de Sinha, 2002).	23
Figura 1.7: Esquema do procedimento de extracção e purificação recomendado para a análise de HAAs nos alimentos (adaptado de Santos <i>et al</i> , 2004).	31
Figura 1.8: Reacção entre uma HA e o diaquilacetal N,N-dimetilformamida através da substituição nucleófila do grupo amino primário por um grupo acetal (adaptado de Barceló-Banachina <i>et al.</i> , 2005).	39
Figura 2.1: Esquema do processo de extracção e purificação das HAAs por SPE com obtenção de duas fracções.	49
Figura 2.2: Esquema do processo de extracção e purificação das HAAs por SPE com obtenção de uma única fracção.....	51
Figura 2.3: Esquema do processo de extracção e purificação das HAs por SPME.	53
Figura 3.1: Cromatograma típico de uma mistura de 14 padrões de HAs, com concentração de 1000 ng/mL, detecção por díodos ($\lambda = 263$ nm).	58
Figura 3.2: Cromatograma típico de HPLC/díodos ($\lambda=263$ nm) obtido na análise da fracção de HAAs apolares (primeira fracção método de Gross modificado) de amostras de carne grelhada.....	62
Figura 3.3: Cromatograma típico de uma injeção de uma mistura de padrões de HAAs, com uma concentração de 50 ng/mL e detecção por fluorescência (λ de 307 nm de excitação e de emissão de 370 nm).	67

Figura 3.4: Cromatogramas típicos das diferentes HAAs nas amostras de carne grelhada.	68
Figura 3.5: Efeitos do tempo e meio de marinada na concentração das HAAs.	70
Figura 3.6: Gráfico bidimensional representando a análise de componentes principais dos dados das HAAs.	73
Figura 3.7: Resultados médios para os 14 atributos sensoriais nas amostras de carne grelhada (controlo, marinada em cerveja e marinada em vinho).	75
Figura 3.8: Cromatograma típico de uma injeção por SPME, de uma mistura de padrões de HAAs, com uma concentração de 100 ng/mL e detecção por fluorescência (λ de 307 nm de excitação e de emissão de 370 nm).	77
Figura 3.9: Cromatogramas típicos de injeção por SPME das diferentes HAAs apolares e da PhIP nas amostras de carne grelhada, com detecção por FLD (Ex. 307 nm e Em 370 nm).	78

Trabalhos desenvolvidos no decurso da preparação desta dissertação:
Publicações e Comunicações.

Publicações:

A. Melo, O. Viegas, R. Eça, C. Petisca, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira "Extraction, detection and quantification of heterocyclic aromatic amines in Portuguese meat dishes by HPLC/diode array" Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies (2007, in press).

A. Melo, O. Viegas, C. Petisca, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira "Interaction between Heterocyclic Aromatic Amines and Beer / Red Wine antioxidants: Effect of Marinades in Grilled Beef" (Submetido ao Journal of Agricultural and Food Chemistry)

Comunicações:

A. Melo, O. Viegas, C. Petisca, R. Eça, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira; Difficulties in quantification of heterocyclic aromatic amines in foods; Sétimo Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação, de 11 a 13 de Out. 2007, Porto.

A. Melo, O. Viegas, C. Petisca, R. Eça, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira; Extraction, detection and quantification of heterocyclic aromatic amines in Portuguese meat dishes by HPLC/Diode array; Sétimo Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências da Nutrição e Alimentação, de 11 a 13 de Out. 2007, Porto.

M. Costa, A. Melo, C. Petisca, I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho. "Formation of heterocyclic aromatic amines in charcoal grilled sardines" No IJUP08, First Meeting of Young Researchers of U.Porto, Porto, 20 - 22 de Fevereiro, 2008.

A. Melo, M. Costa, R. Eça, I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho. "Influence of beer antioxidative properties on the formation of the heterocyclic amine PhIP in grilled beef" No IJUP08, First Meeting of Young Researchers of U.Porto, Porto, 20 - 22 de Fevereiro, 2008.

A. Melo, C. Petisca, R. Eça, I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho. "Quantification of less polar heterocyclic amines in grilled meat by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography-fluorescence" No AOAC Europe Section International Workshop: Enforcement of European Legislation on Food and Water: Analytical and Toxicological Aspects e II Encontro Nacional de Bromatologia, Hidrologia e Toxicologia, Lisboa, 17 e 18 de Abril, 2008.

ABREVIATURAS

- 4-CH₂OH-8-MeIQx** – 2-Amino-4-hydroxymetil-3,8-dimethylimidazo-[4,5-*f*]quinoxalina
- 4'-hydroxy-PhIP** – 2-Amino-6-(4-hidroxifenil)-1-metilimidazo[4,5-*b*]piridina
- 4,8-DiMeIQx** – 2-Amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina
- 4,7,8-TriMeIQx** – 2-Amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina
- 7,8-DiMeIQx** – 2-Amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina
- 7,9-DiMeIgQx** – 2-Amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5-*g*]quinoxalina
- 7-MeIgQx** – 2-Amino-1,7-dimetil-imidazo[4,5-*g*]quinoxalina
- AaC** – 2-Amino-9*H*-pirido[2,3-*b*]índole
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- AMPS** – ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonico
- BHA** – Butil Hidroxi Anisol
- bis-TFMBZ-Br** - ,5-bis(trifluorometil)benzilo
- CE** – Electroforese Capilar
- Cre-P-1** – 4-Amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1*H*,6*H*-pirrol-[3,4-*f*]benzimidazole-5,7-dione
- CW-TPR** – Carbowax-Templated Resin
- CYP** – citocromo P450
- DAD** – Detecção por díodos
- DMF-DMA** – dimetilacetal N,N-dimetilformamida
- DMIP** – 2-Amino-1,6-dimetilimidazo[4,5-*b*]-piridina
- ED** – Detecção electroquímica
- ELISA** – Enzyme Linked Immunosorbent assay
- EMX** – Enzimas Metabolizadoras de Xenobióticos
- FLD** – Detecção por fluorescência
- GC** – Cromatografia Gasosa
- Glu-P-1** – 2-Amino-6-metildipirido [1,2-*a*:3',2'-*d*] imidazole
- Glu-P-2** – 2-Amino-dipirido [1,2-*a*:3',2'-*d*] imidazole
- GSH** – Glutathiona
- GST** – Glutathiona S-transferase
- Harman** - 1-Amino-9*H*-pirido[3,4-*b*]indole

HAAs – Aminas Aromáticas Heterocíclicas

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

IFP – 2-Amino-1,6-dimetil-furo[3,2-e]imidazo[4,5-b]-piridina

IQ – 2-Amino-3-metilimidazo [4,5-*f*] quinolina

IQx – 2-Amino-3-metilimidazo [4,5-*f*] quinoxalina

IARC – Agência Internacional para a Pesquisa e Cancro

LC-MS – Cromatografia Líquida de Alta Resolução detecção por Espectroscopia de Massa

Lys-P-1 – 3,4-Ciclopentenopirido – [3,2-*a*] carbazole

MeAaC – 2-amino-3-metil-9*H*-pirido [2,3-*b*] índole

MeIFP – 2-Amino – (1 ou 3), 6-dimetilfuro – [2,3 (ou 3,2) -e] imidazo [4,5-*b*] piridina

MeIQ – 2-Amino-3,4-dimetilimidazo [4,5-*f*] quinolina

MeIQx – 2-Amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-*f*] quinoxalina

MIPs – *molecular imprinted polymers*

MS – Espectrometria de Massa

MNNG – *N*-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina

NAT – N-acetiltransferases

Norharman – 9*H*-pirido [3,4-*b*] índole

Orn-P-1 – 4-Amino-6-metil-1*H*-2,5,10,10*b*-tetraaza-fluoranteno

Phe-P-1 – 2-Amino-5-fenilpiridina

PhIP – 2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-*b*] piridina

PCB – Policlorobifenilo

PCA – Análise de componentes principais

PRS – Ácido Propilsulfônico

SIM – Monitorização de ião seleccionado

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Micro extração em fase sólida

SULT – Sulfotransferase

TMIP – 2-Amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5-*b*]-piridina

Trp-P-1 – 3-Amino-1,4-dimetil-5*H*-pirido [4,3-*b*] indole

Trp-P-2 – 3-Amino-1-metil-5*H*-pirido [4,3-*b*] índole

UGT – UDP-Glucuronosiltransferase

UV – Ultra Violeta

INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS DO TRABALHO

A preparação dos alimentos visa melhorar as suas condições microbiológicas, de digestibilidade e respectivas propriedades sensoriais. Contudo, em algumas situações pode levar à produção de diversos tipos de substâncias tóxicas, verificando-se uma preocupação crescente com os efeitos nocivos que estas podem acarretar. A exposição individual a diferentes quantidades de substâncias genotóxicas depende dos hábitos alimentares e das diferentes práticas culinárias (Dabrowski e Sikorski, 2004; Jägerstad e Skog, 2005).

O processamento térmico dos alimentos é, provavelmente, a tarefa mais comumente usada na indústria alimentar. As operações de aquecimento estão associadas quer à arte culinária, utilizando métodos como fritar, assar, gratinar, quer a processos tecnológicos, tais como a evaporação, a esterilização e outros processos semelhantes. Processos suaves de aquecimento, como a pasteurização, podem acarretar diversas alterações nos alimentos a eles submetidos. O efeito adverso geralmente observado consiste na perda de nutrientes termolábeis, especialmente vitaminas e aminoácidos, e consequentemente, o valor nutricional do alimento é diminuído (Reineccius, 2006). Durante o aquecimento dos alimentos, as reacções de Maillard causam também modificações no sabor e na cor. Quando os alimentos são sujeitos a temperaturas elevadas (200-300°C), produzem-se compostos potencialmente tóxicos e prejudiciais para o homem.

No final da década de 70 foi descoberta uma nova classe de compostos altamente mutagénicos – as Aminas Aromáticas Heterocíclicas (HAAs). O cientista Japonês Nagao e os seus colaboradores (1977), utilizando o teste de Ames detectaram actividade mutagénica em condensados de fumo e nos extractos obtidos a partir da área carbonizada de amostras de carne e peixe grelhado (Hui *et al*, 2001).

Estudos *in vitro* e em animais de experiência evidenciam que as HAAs podem lesionar o ADN. Embora, a sua ingestão esteja associada a um risco aumentado no aparecimento de vários tipos de cancro humano (Turesky, 2002, 2005), outros estudos não apresentam uma tão clara associação com o aparecimento de certos tipos de cancro. Assim, torna-se necessária a obtenção de resultados consistentes e a avaliação da relação dose/resposta entre o consumo das HAAs e o aparecimento de cancro (Sinha e Rothman, 1999). A avaliação do risco que as HAAs representam para os humanos

requer uma estimativa da exposição a essas substâncias, sendo necessário desenvolver métodos fiáveis para estimar os níveis de HAAs ingeridos pela população. A principal fonte de ingestão destes compostos reside na carne consumida através da dieta. Deste modo, para avaliar a exposição de uma dada população às HAAs é necessário obter informação sobre o consumo de carne, os métodos culinários mais vulgarmente usados e os níveis de HAAs encontrados na carne nos diferentes graus de cocção. Esta informação depende dos hábitos alimentares referentes a cada tipo de população.

A concentração de HAAs em carne cozinhada ocorre em concentrações da ordem dos nanograma. Evitar completamente a formação de HAAs nos alimentos não é possível, mas a prevenção da sua formação parece ser uma medida adequada. A chave para reduzir a exposição diária às HAAs consiste na identificação e classificação de práticas culinárias que minimizem a sua formação. Os métodos propostos para a sua redução deverão conferir bom sabor e aspecto agradável ao alimento, e devem ser simples para serem facilmente adoptados pelos consumidores.

Existem numerosas formas através das quais se podem diminuir os níveis de exposição do organismo às HAAs, nomeadamente, reduzir o consumo de carne, remover as zonas queimadas da carne antes do seu consumo, evitar o contacto directo com a fonte de calor, e marinar a carne antes de cozinhar, pois, alguns dos ingredientes utilizados nas marinadas são reconhecidos como inibidores da formação de HAAs (Wakabayashi e Sugimura, 1998; Nerurkar *et al*, 1999; Salmon *et al*, 2006).

O ácido ascórbico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico, o ácido gálico, a N-acetilcisteína, a prolina e a tioprolina são os inibidores mais estudados, e pensa-se que estes actuem como inibidores dos radicais livres, gerados nas reacções de Maillard. Alguns estudos referem que a adição de produtos naturais contendo antioxidantes, tais como, os polifenóis, antes de submeter a carne ao calor, reduz a formação de HAAs. Vários autores demonstram o efeito de vários aditivos: o chá (Weisburger *et al*, 1994; Weisburger *et al*, 2002), o vinho tinto (Busquets *et al*, 2006), o azeite (Persson *et al*, 2003) e o alho (Murkovic *et al*, 1998; Gibis, 2007). Através de vários mecanismos, estes inibidores complexam os radicais livres gerados durante a formação da HAAs. No entanto, os antioxidantes também exercem um efeito anti e pró-oxidativo, dependendo da sua concentração e das interacções com outros componentes alimentares, durante a cocção (Skog *et al*, 2000). Alguns estudos iniciais indicavam que o antioxidante de síntese, BHA, adicionado ao bife atenuava a mutagenicidade das HAAs após o processo de fritura. Contudo, estudos mais recentes verificaram que a actividade do MeIQx está

aumentada na presença de BHA e de outros antioxidantes. Estes mecanismos de acção ainda não se encontram devidamente clarificados (Dashwood, 2002).

É importante conhecer a composição em HAAs presentes na carne cozinhada em condições normais e encontrar formas correctas de minimizar os seus teores. Deste modo, foram delineados como objectivos deste trabalho:

- testar e comparar diferentes métodos de extracção da HAAs e seleccionar o mais adequado para as isolar, identificar inequivocamente e dosear em amostras de carne, atendendo a que as HAAs se encontram em quantidades baixas (0.1-50 ng/g).
- avaliar a composição em HAAs em carne confeccionada por diferentes processos, tradicionalmente usados na dieta dos portugueses, com e sem adição de temperos, em dois níveis diferentes de confecção (mal passado e bem passado).
- avaliar a possibilidade de reduzir a formação de HAAs em carne grelhada usando marinadas de cerveja ou de vinho, antes de cozinhar. Estudar a influência do tempo de marinada na redução do teor de HAAs. Comparar com a composição em HAAs de amostras não marinadas. Avaliar a influência das marinadas nas características sensoriais da carne grelhada, recorrendo a análise descritiva sensorial com um painel de provadores treinado.

1 – AMINAS AROMÁTICAS HETEROCÍCLICAS (HAAS)

A descoberta das HAAs resultou de uma experiência do dia a dia, e que conduziu a uma das maiores investigações na área da carcinogénese ambiental. Quando um dos elementos da equipa do doutor Nagao observava a sua esposa a grelhar peixe na cozinha, o fumo produzido captou a sua atenção. Se o fumo do cigarro contém muitos compostos mutagénicos, não existirão também compostos mutagénicos no fumo produzido durante o processo de grelha do peixe? Posteriormente, foi confirmado no laboratório, que o fumo produzido pelo processo de grelha do peixe, quando recolhido num filtro de fibra de vidro e dissolvido em dimetilsulfóxido, apresentava forte mutagenicidade para a *Salmonella typhimurium* TA98 (Sugimura *et al*, 2004). As estirpes teste de *Salmonella typhimurium* normalmente usadas são as estirpes TA98 e TA1538, que detectam mutações por *frameshift*, e em uma menor extensão são utilizadas as estirpes TA100 e TA1535, que detectam mutações por substituição de pares de bases. Nagao e os seus colaboradores notaram que a actividade mutagénica do peixe e da carne grelhada era especialmente pronunciada na estirpe TA98, com activação metabólica na presença de homogeneizados de fígado de ratos (S9 mix) tratados com Aroclor 1254 (PCB) (Hui *et al*, 2001).

As HAAs podem conter na sua estrutura entre dois a cinco (geralmente três) anéis aromáticos, condensados com um ou mais átomos de azoto e, usualmente, um grupo amino exocíclico (Felton *et al* 1997; Sugimura *et al*, 2004; Alaejos *et al*, 2008). Actualmente, encontram-se identificadas mais de 20 HAAs em amostras de carne e peixe, segundo as práticas normais de preparação dos alimentos. As estruturas químicas, as abreviaturas mais comuns e os nomes das principais HAAs estão apresentados na Figura 1.1 e na Tabela 1.1.

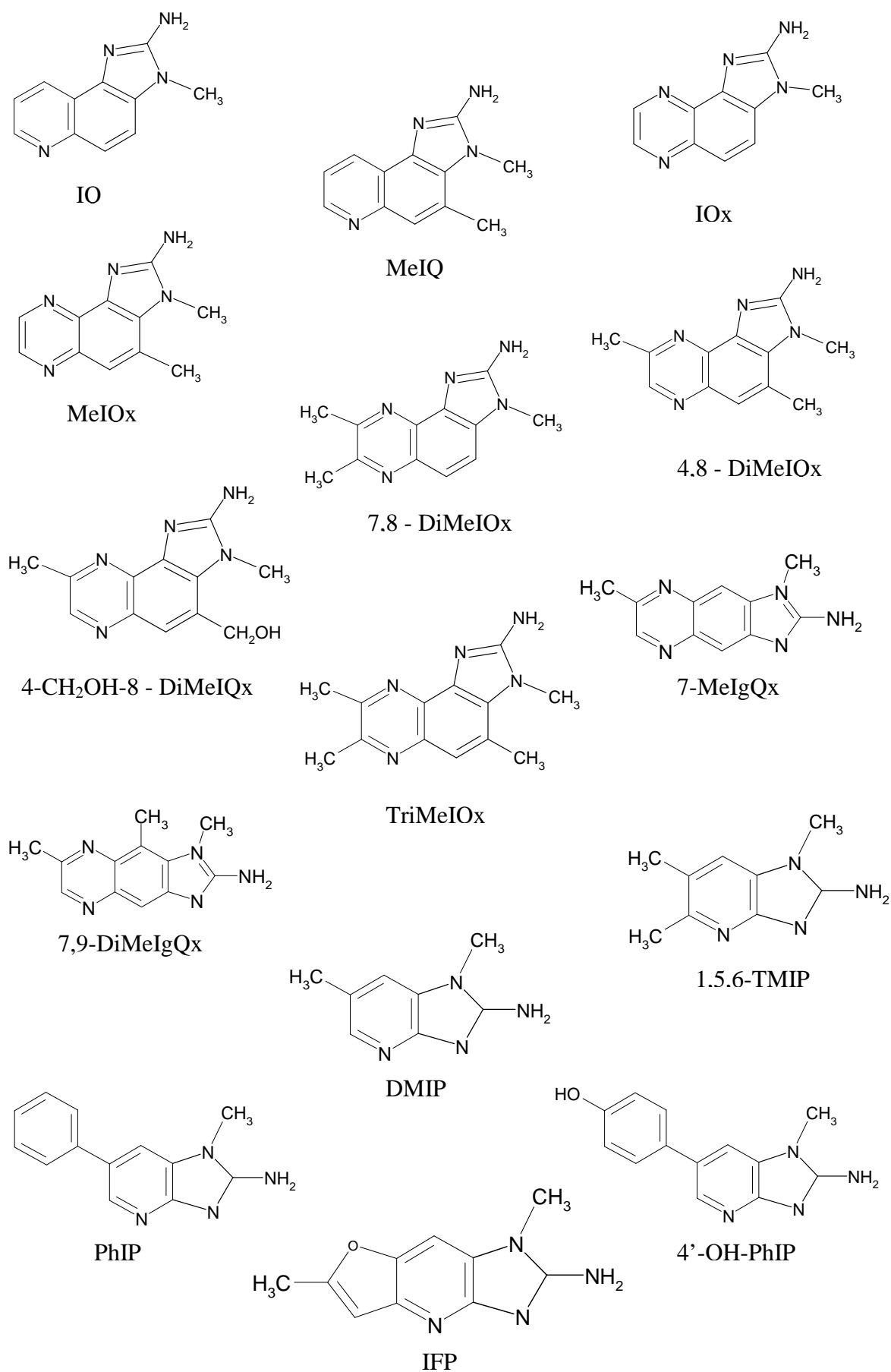
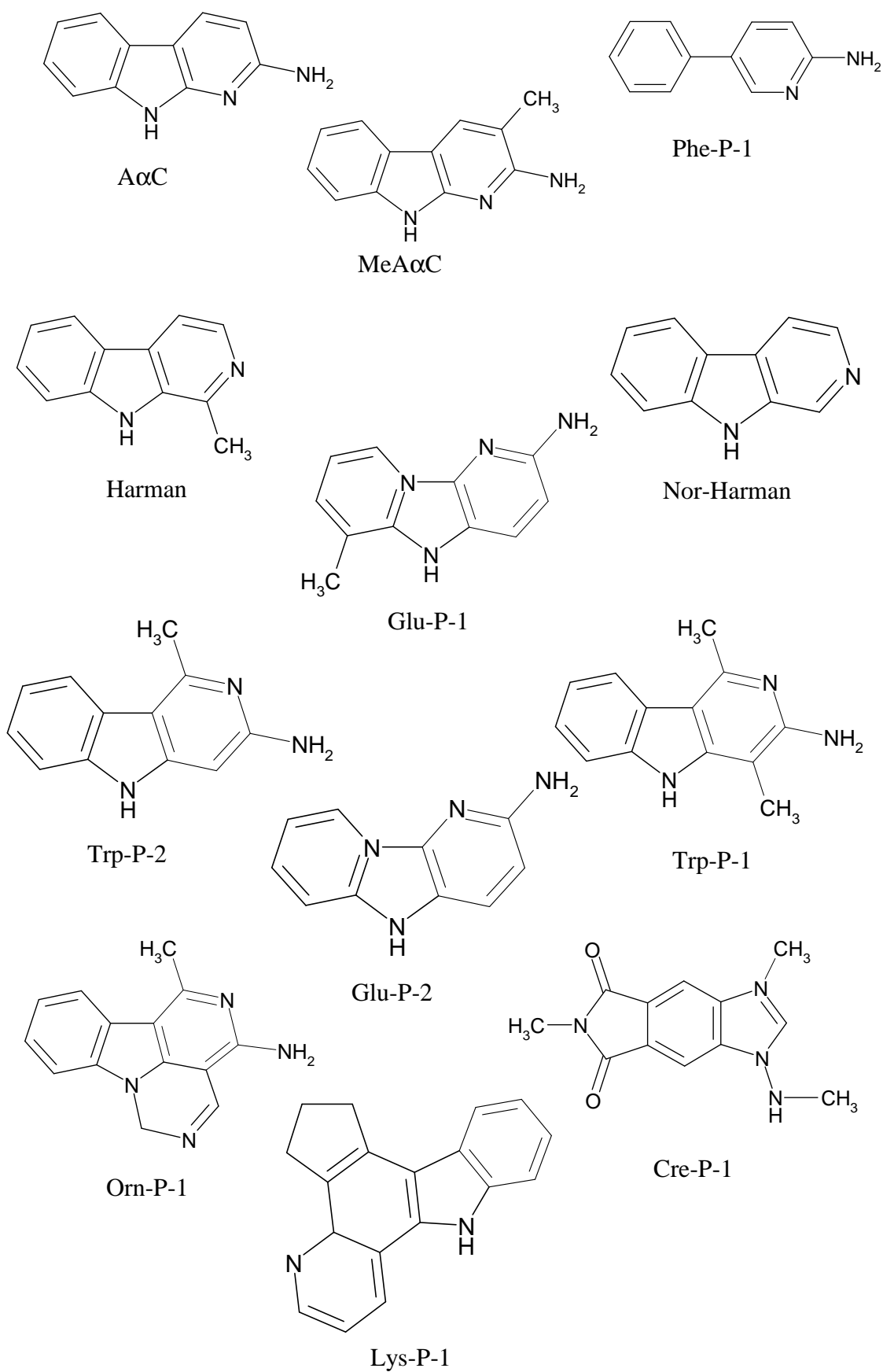


Figura 1.1: Estruturas químicas das principais HAAs (adaptado de Alaejos *et al*, 2008).



Continuação Figura 1.1: Estruturas químicas das principais HAAs (adaptado de Alaejos *et al*, 2008).

Tabela 1.1: Abreviaturas e nomes químicos das principais HAAs (adaptado de Alaejos *et al*, 2008).

Abreviaturas	Nome
HAAs Térmicas: aminoimidazoazarenos	
Quinolinas	
IQ	2-Amino-3-metil-imidazo[4,5- <i>f</i>]quinolina
MeIQ	2-Amino-3,4-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]quinolina
Quinoxalinas	
IQx	2-Amino-3-metil-imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina
MeIQx	2-Amino-3,8-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina
4,8-DiMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina
7,8-DiMeIQx	2-Amino-3,7,8-trimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina
4,7,8-TriMeIQx	2-Amino-3,4,7,8-tetrametil-imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina
4-CH ₂ OH-8-MeIQx	2-Amino-4-hidroxyetil-3,8-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalina
7,9-DiMeIQx	2-Amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5- <i>g</i>]quinoxalina
7-MeIQx	2-Amino-1,7-dimetil-imidazo[4,5- <i>g</i>]quinoxalina
Piridinas	
PhIP	2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridina
4'-hydroxy-PhIP	2-Amino-6-(4-hidroxifenil)-1-metilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridina
DMIP	2-Amino-1,6-dimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina
TMIP	2-Amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina
IFP	2-Amino-1,6-dimetil-furo[3,2- <i>e</i>]imidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina

Continuação Tabela 1.1: Abreviaturas e nomes químicos das principais HAAs (adaptado de Alaejos *et al.*, 2008).

Abreviaturas	Nome
HAAs Pirolíticas: Carbolinas	
Piridoindoles	
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimetil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indole
Trp-P-2	3-Amino-1-metil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i>]indole
AαC	2-Amino-9 <i>H</i> -pirido[2,3- <i>b</i>]indole
MeAαC	2-amino-3-metil-9 <i>H</i> -pirido[2,3- <i>b</i>]indole
Harman	1-Amino-9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indole
Norharman	9 <i>H</i> -pirido[3,4- <i>b</i>]indole
Piridoimidazoles	
Glu-P-1	2-Amino-6-metildipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazole
Glu-P-2	2-Amino-dipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazole
Outras Estruturas	
Lys-P-1	3,4-Ciclopentenopirido-[3,2- <i>a</i>]carbazole
Orn-P-1	4-Amino-6-metil-1 <i>H</i> -2,5,10,10 <i>b</i> -tetraaza-fluoranteno
Phe-P-1	2-Amino-5-fenilpiridina
Cre-P-1	4-Amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -pirrol-[3,4- <i>f</i>]benzimidazole-5,7-dione

1.1 – FORMAÇÃO

As HAAs que têm servido de base para a maior parte dos estudos mutagénicos podem ser separadas em duas classes baseando-se nos seus precursores e na temperatura de formação. Embora se verifique a formação de HAAs a baixas temperaturas é com o aumento da temperatura que a sua concentração aumenta. A primeira classe de HAAs, aminas do tipo IQ ou térmicas, é formada durante o processamento dos alimentos, pois ao utilizarem-se temperaturas moderadas (190°C – 200°C) formam-se compostos aminoimidazo, que envolvem reacções complexas entre a creatinina e fragmentos de hexoses, pirazinas ou derivados de piridina formados através de reacções de Maillard (Jägerstad *et al*, 1998; Felton *et al*, 1999; Solyakov *et al*, 1999, Pais *et al*, 1999). Alguns exemplos desta classe de compostos (Tipo IQ) incluem IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx e PhIP.

As vias de formação destas HAAs estão esquematizadas na Figura 1.2. A creatina forma a parte amino-imidazo da molécula por ciclização e eliminação de água, enquanto a restante parte dos compostos IQ, como a piridina e a pirazina, resultam da degradação dos produtos de Strecker. Uma das vias envolve a formação de uma estrutura em forma de anel bimolecular, a partir da forma enol do glicolaldeído alquilamina, e que é seguido pela formação dos radicais livres através de um processo de oxidação. A outra via traduz a formação de iões piridina a partir do gloxal monoalquilamina, seguido de uma redução para produzir os radicais livres. Os respectivos compostos intermediários (glicolaldeído alquilamina e gloxal monoalquilamina) são formados pela reacção do glicolaldeído e gloxal com compostos amínicos. O sistema glicolaldeído reage mais rapidamente e produz mais radicais livres do que o sistema gloxal (Murkovic, 2004; Vitaglione e Fogliano, 2004). Estes compostos podem ser subdivididos segundo a sua estrutura química em quinolinas, quinoxalinas e piridinas.

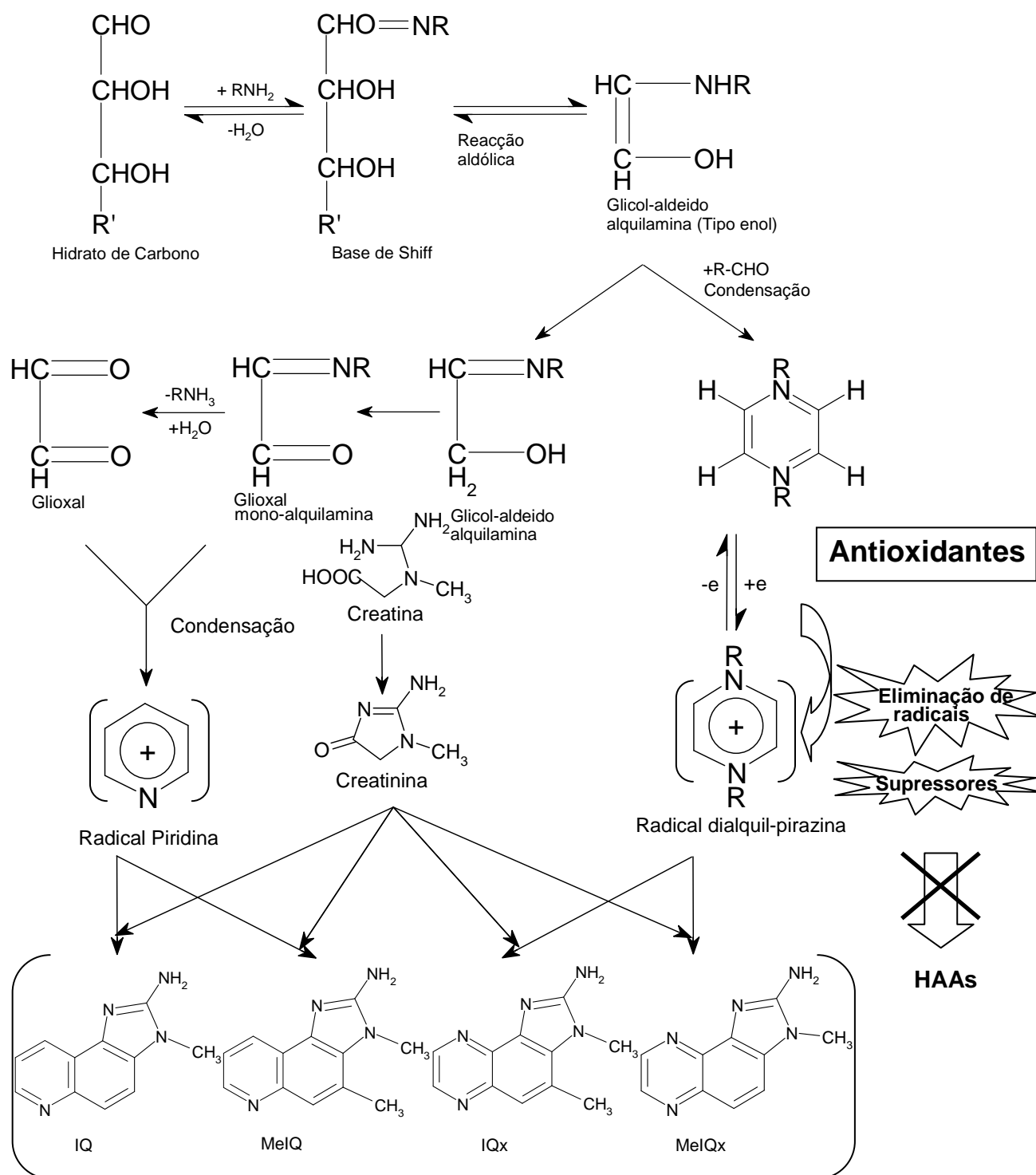


Figura 1.2: Esquema de formação das HAAs e possível local para interferência com os antioxidantes (adaptado de Vitaglione e Fogliano, 2004).

A segunda classe de HAAs, do tipo não IQ ou pirolíticas, é formada através da decomposição térmica de aminoácidos, como o triptofano ou proteínas, quando submetidas a elevadas temperaturas ($>300^\circ\text{C}$). Estas incluem compostos como AαC,

MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 e Glu-P-2 (Jägerstad *et al*, 1998; Turesky, 2005; Sugimura *et al*, 2004).

1.2 – METABOLISMO

Alguns estudos realizados em vários órgãos de ratinho, rato e primatas indicam que as HAAs possuem efeitos tumorogénicos (Skog, 2002). Tal como se verifica com a maior parte dos carcinogénicos genotóxicos, as HAAs não interagem directamente com o ADN, mas requerem uma activação enzimática para produzirem os seus efeitos genotóxicos (Turesky e Vouros, 2004; Novak *et al*, 2004; Baranczewski *et al*, 2004; Xue e Warshawsky, 2005).

A extrapolação dos dados de carcinogenicidade em animais, para avaliar os riscos para a saúde humana das HAAs requer que se tenha em consideração, a influência das diferentes espécies na actividade catalítica e a avaliação das enzimas que metabolizam xenobióticos (EMX), que estão envolvidas na bioactivação e destoxificação destas. Em contraste com muitos modelos animais experimentais, os humanos apresentam uma grande variedade inter-individual nos níveis de expressão de EMX de Fase I e Fase II. De facto, muitas das EMX envolvidas no metabolismo das HAAs nos humanos apresentam um polimorfismo genético comum que pode afectar os níveis de expressão proteica, estabilidade proteica e actividade catalítica, influenciando assim, a biotransformação dos tóxicos e os riscos para a saúde das populações expostas. Turesky (2005) estudou essas diferenças nos níveis de expressão de EMX e actividades catalíticas que poderiam levar a incertezas na extrapolação dos dados da toxicidade animal para a avaliação do risco humano das HAAs.

Na Figura 1.3 estão apresentadas as diferentes vias metabólicas de Fase I e Fase II de diferentes HAAs formadas nos alimentos cozinhados (IQ, 8-MeIQx, PhIP e 2-AαC), que foram objecto de estudo em experiências animais e humanas. Neste metabolismo das HAAs estão envolvidas enzimas que incluem o citocromo P450 (CYP), sulfotransferases (SULT), UDP-glucuronosiltransferase (UGT), N-acetiltransferases (NAT) e glutathione S-transferase (GST).

Nos animais, as enzimas dos microsomas da família do CYP1A, principalmente a enzima CYP1A2 cataliza a oxidação do anel aromático das HAAs originando

produtos destoxificados. Também se verifica uma oxidação do grupo amino exocíclico das HAAs, dando origem a um metabolito genotóxico, N-hidroxil-HA, sendo este identificado como a maior parte dos metabolitos resultantes das reacções de Fase I e representando pelo menos 90% do metabolismo das enzimas do microsoma hepático das HAAs (Lynch *et al*, 1995). O metabolito N-hidroxil-HA formado pode ligar-se ao DNA, ou vir a sofrer activação através das enzimas de Fase II, como as NAT e SLUT, originando ésteres instáveis que rapidamente reagem com o ADN, principalmente no carbono C8 e átomos N2 da desoxiguanosina.

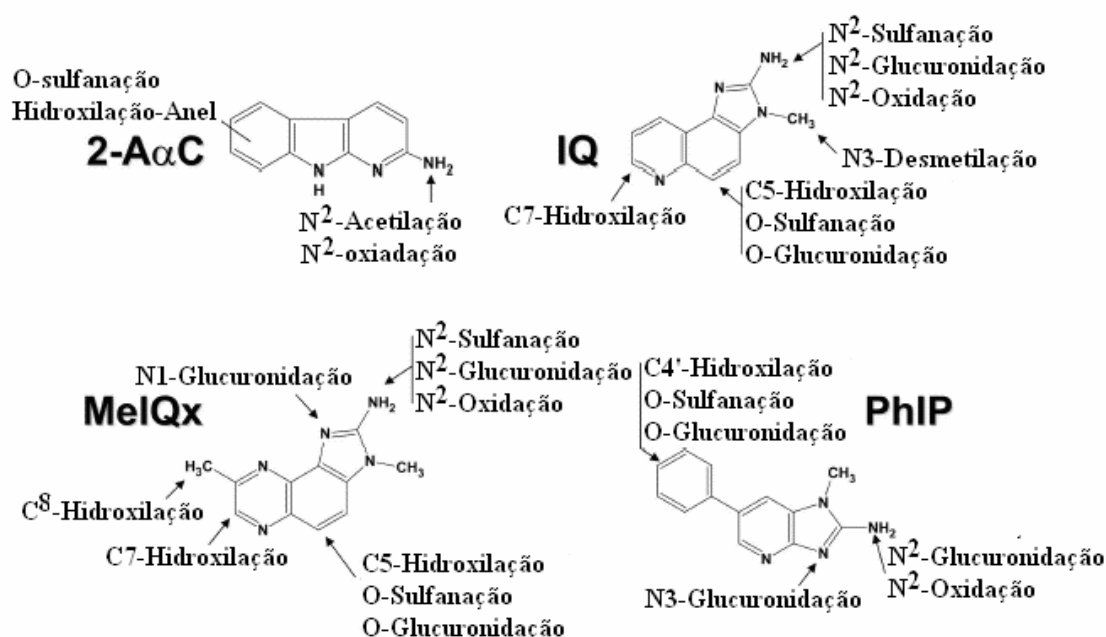


Figura 1.3: Principais vias do metabolismo das HAs em modelos animais e humanos (adaptado de Turesky, 2005).

Alternativamente, algumas N-hidroxil-HA electrofílicas e ésteres de N-hidroxil-HA podem sofrer uma redução que promova o aparecimento dos compostos iniciais, através da acção da glutathione (GSH), ou da catálise com a GST e a formação de conjugados da glutathione. Uma redutase NADPH-dependente também foi reportada para reduzir N-hidroxil-HA ao seu composto inicial (Figura 1.4).

Existem pelo menos dois e dez polimorfismos genéticos humanos da NAT1 e NAT2, respectivamente. A NAT1 é principalmente expressa geneticamente nos tecidos extra hepáticos, enquanto a NAT2 é predominantemente encontrada no fígado e no

epitélio intestinal. As NATs metabolizam várias drogas clínicas que possuem os grupos funcionais amino e hidrazina. A *N*-acetilação dos metabolitos excretados é reconhecida como a principal via de destoxificação no metabolismo das arilaminas em animais de experiência e em humanos. Pode referir-se que muitas HAAs são substratos pobres para as NAT, e não sofrem *N*-acetilação como mecanismo de destoxificação em roedores ou humanos. Mas, as NATs catalizam a bioativação dos metabolitos N-hidroxil-HAAs para formar os ésteres altamente reactivos que se ligam ao ADN (Turesky, 2005).

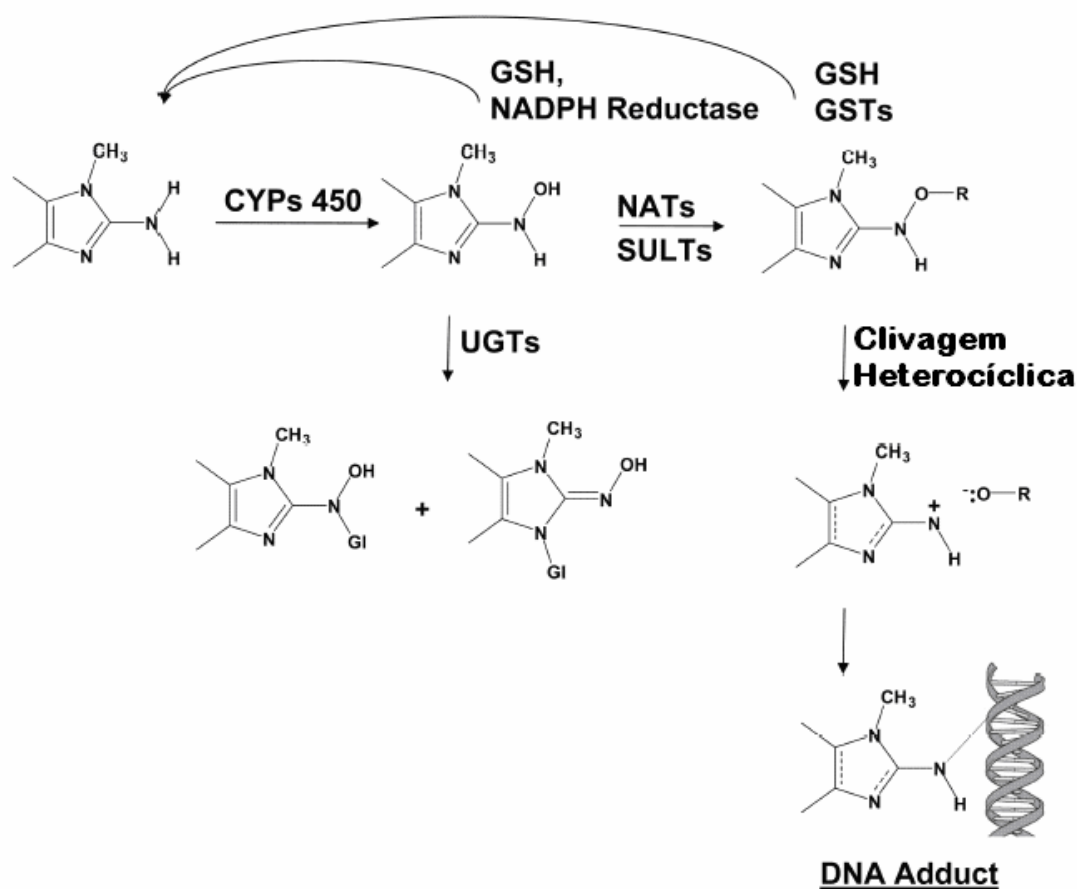


Figura 1.4: Mecanismo de toxicidade e destoxificação dos metabolitos N-hidroxil-HCA (adaptado de Turesky, 2005).

1.3 – TOXICIDADE

A preocupação com a toxicidade provocada pelas HAAs, levou a que estas fossem testadas quanto à sua actividade mutagénica, *in vitro* e *in vivo*, tendo-se obtido resultados positivos para a grande maioria delas. As aminas IQ e MeIQ pertencem à classe dos super mutagénios, algumas HAAs apresentam uma mutagenicidade baixa, e as aminas Harman e Norharman não são mutagénicas, mas potenciam a mutagenicidade das outras HAAs. A Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro (IARC), em 1993, analisou os trabalhos publicados em HAAs, até essa data, e clasificou a IQ como um composto provavelmente carcinogénico para os humanos (grupo 2A) e as MeIQ, MeIQx, PhIP, A α C, MeA α C, Trp-P1, Trp-P-2 e a Glu-P-1 com possível actividade carcinogénica para os humanos (grupo 2B), recomendando necessidade de redução da exposição a estes compostos (Busquets *et al*, 2004)

Os produtos da pirólise de aminoácidos e mutagénios dos alimentos ricos em fibras musculares foram testados através de ensaios de mutagenicidade, juntamente com o teste de Ames, e quase sempre indicaram resultados positivos (Frederiksen, 2005). As HAAs não apresentam propriedades mutagénicas para as estirpes de *Salmonella typhimurium*, pois a sua actividade mutagénica é apenas exercida após a activação metabólica. Pode referir-se como exemplo a realização do teste de Ames com homogenizados de fígado de rato tratado com PCBs ou outro indutor (Hui *et al*, 2001).

A actividade mutagénica de algumas HAAs é bem conhecida e está resumida na Tabela 1.2.

As aminas térmicas designadas por quinolinas e quinoxalinas (IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx e 7,8-DiMeIQx) são os mutagénios que exibem uma maior mutagenicidade para a *S. typhimurium*, enquanto que a PhIP e os α -carbonilos (A α C e MeA α C) apresentam uma menor actividade mutagénica. A avaliação do potencial mutagénico das aminas não pode ser apenas efectuada através de testes bacteriológicos, pois muitas delas (IQ, MeIQ e MeIQx) são apenas fracos positivos em ensaios de mutagenicidade quando baseados em células de mamíferos, enquanto o PhIP, que está presente nos alimentos em níveis muito superiores aos da MeIQx, é muito mais efectiva na indução do dano no ADN em células de mamíferos. Quando se realizou o teste de *Dlb-1* locus (no rato) o PhIP mostrou ser um mutagénio *in vivo*, enquanto a MeIQx não apresentava essa característica. Sem esquecer que é difícil avaliar as implicações destas

observações para os humanos, devido à capacidade e actividade do CYP1A (Lynch *et al*, 1995)

Tabela 1.2: Mutagenicidade das HAAs, calculada através do teste de Ames, na *S. typhimurium* TA98 e TA100 (adaptado de Sugimura *et al*, 2004)

HA	Mutantes/ μ g	
	TA98	TA100
MeIQ	661000	30000
IQ	433000	7000
DiMeIQx	183000	8000
7,8-DiMeIQx	163000	9900
MeIQx	145000	14000
Trp-P-2	104200	1800
4-CH ₂ OH-8-MeIQx	99000	3000
IQx	75400	1500
Glu-P-1	49000	3200
Trp-P-1	39000	1700
Glu-P-2	1900	1200
PhIP	1800	120
A α C	300	20
MeA α C	200	120
4'-hydroxy-PhIP	2	Nenhum resultado disponível

A mutagenicidade específica de algumas das HAAs avaliada pelo teste de Ames é muito superior à de outros carcinogénios genotóxicos bem conhecidos, como o benzo[a]pireno, a aflatoxina B₁ e o MNNG (Tabela 1.3). Devido à grande sensibilidade que este ensaio apresenta para as HAAs, ele tem sido usado para quantificar as HAAs em amostras de alimentos e de meios biológicos.

Tabela 1.3: Mutagenicidade de diferentes compostos, determinada e calculada através do teste de Ames, na *S. typhimurium* TA100 (adaptado de Sugimura, 1997)

Composto	Mutantes/ μ g
2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil)acrilamida (AF-2)	42000
Aflatoxina B ₁	28000
<i>N</i> -Metil- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina (MNNG)	870
Benzo[a]pireno	660
<i>N,N</i> -Dimetilnitrosamina	0,23

O potencial carcinogénico das 10 HAAs encontradas em várias espécies de alimentos (IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, A α C e MeA α C) foram investigados em estudos relacionados com a área alimentar e efectuados em animais roedores, sendo estes dados compilados por Sugimura (1997). Os resultados destes trabalhos mostraram que quase todas as HAAs possuem actividade carcinogénica nos múltiplos órgãos de animais roedores, pois induzem um aumento significativo dos tumores em comparação com os controlos, na maior parte dos casos antes das 104 semanas em que o estudo foi realizado (Tabela 1.4).

Algumas HAAs produzem tumores ao nível do cólon, da glândula mamária e da próstata, os quais são locais comuns de detecção de neoplasias, devido muitas vezes aos hábitos alimentares existentes nos países Ocidentais. Mais de dois terços dos estudos epidemiológicos humanos publicados, correlacionando a ingestão de alimentos com as respectivas práticas culinárias de preparação, mostraram um risco acrescido de aparecimento de cancro para os indivíduos que preferem os alimentos cozinhados bem passados. Estes estudos epidemiológicos identificam a mama, o cólon, o estômago, o pulmão e o esófago como sendo os órgãos alvo primários, comuns nas neoplasias respeitantes aos países ocidentais. Muitos autores descreveram novos métodos culinários com o objectivo de reduzir os níveis de HAAs, indicando que se deve colocar os alimentos a marinar, baixar a temperatura de fritura e virar frequentemente os alimentos durante a respectiva fritura (Felton *et al*, 2004).

Tabela 1.4: Carcinogenicidade de diferentes HAAs em ratos e ratinhos (adaptado de Sugimura *et al*, 2004)

HAC	Animal	Espécie	Concentração na dieta (ppm)	Período experimental (semanas)	Órgãos alvo
Trp-P-1	Rato	F344	150	52	Fígado
	Ratinho	CDF1	200	89	Fígado
Trp-P-2	Rato	F344	100	112	Fígado, bexiga
	Ratinho	CDF1	200	89	Fígado
Glu-P-1	Rato	F344	500	64	Fígado, intestino grosso e delgado, glândula clitoral
	Ratinho	CDF1	500	57	Fígado, vasos sanguíneos
Glu-P-2	Rato	F344	500	104	Fígado, intestino grosso e delgado, glândula clitoral
	Ratinho	CDF1	500	84	Fígado, vasos sanguíneos
AαC	Rato	F344	800	104	Sem Tumores
	Ratinho	CDF1	800	98	Fígado, vasos sanguíneos
MeAαC	Rato	F344	100	100	Fígado
	Ratinho	CDF1	800	84	Fígado, vasos sanguíneos
IQ	Rato	F344	300	55-72	Fígado, intestino grosso e delgado, glândula clitoral, pele
	Ratinho	CDF1	300	96	Fígado, pulmão, estômago
MeIQ	Rato	F344	300	40	Intestino grosso, pele, cavidade oral, glândula mamária
	Ratinho	CDF1	100	91	Fígado, estômago
MeIQx	Rato	F344	400	61	Fígado, glândula clitoral, pele
	Ratinho	CDF1	600	84	Fígado, pulmão, tecido hematopoiético
PhIP	Rato	F344	400	52	Intestino grosso, Glândula mamária, Tecido linfóide
	Ratinho	CDF1	400	82	Tecido linfóide

1.4 – EXPOSIÇÃO

Através dos alimentos cozinhados, os humanos estão permanentemente expostos aos malefícios provocados pelas HAAs (Weisburger, 2002). As HAAs foram detectadas nas proteínas contidas na dieta do regime alimentar ocidental, quando os alimentos são cozinhados a temperaturas normais. A temperatura, a duração do aquecimento e o método de aquecimento influenciam a extensão da formação das HAAs nos alimentos cozinhados. Estas são encontradas nos alimentos com uma concentração na ordem dos nanograma por grama (Skog *et al*, 1997; Jägerstad *et al*, 1998; Hui *et al*, 2001; Borgen e Skog, 2004).

O risco da exposição crónica aos compostos potencialmente carcinogénicos está relacionado com a dieta adoptada, dependendo da dose, da frequência de exposição a cada composto e da susceptibilidade genética característica de cada indivíduo (Butler *et al*, 2003).

O PhIP é a HAA mais abundante nos alimentos cozinhados, sendo a quantidade diária ingerida, estudada na população americana, entre 280-460 ng por dia. Diferentes estudos mostraram que o PhIP está relacionado com o risco de aparecimento de diferentes cancros, como o da mama (Nagao *et al* 2002; Felton *et al*, 2002; Snyderwine, 1994; Hirose *et al*, 2002) e do cólon (Augustson *et al*, 1999). Contudo, ainda não é bem conhecido o mecanismo de acção destes carcinogénicos, aos quais os humanos estão expostos quase todos os dias.

A avaliação do risco que as HAAs produzem em humanos requer uma estimativa do grau de exposição a essas substâncias (Knize *et al*, 1995; Gooderham *et al*, 1996, 1997; Keating *et al*, 1999; Keating e Bogen, 2001). Esta tarefa implica o desenvolvimento de métodos para estimar os níveis de HAAs ingeridos pela população. Torna-se necessário, por isso, o desenvolvimento de uma base de dados, para ser usada em conjunto com um questionário validado de frequência alimentar de carne cozinhada, que dê informação sobre o consumo de carne, os métodos culinários mais vulgarmente usados e os níveis de HAAs presentes na carne, referente aos diferentes graus de cocção (Figura 1.5). Esta informação depende dos hábitos alimentares de cada população. A avaliação da exposição resulta da identificação de marcadores biológicos de exposição interna e de estudos metabólicos intensivos, com indivíduos que consomem quantidades

controladas de carne cozinhada, a baixas e a altas temperaturas (Voskuil *et al*, 1999; Sinha, 2002; Busquets *et al*, 2004; Cross e Sinha, 2004).

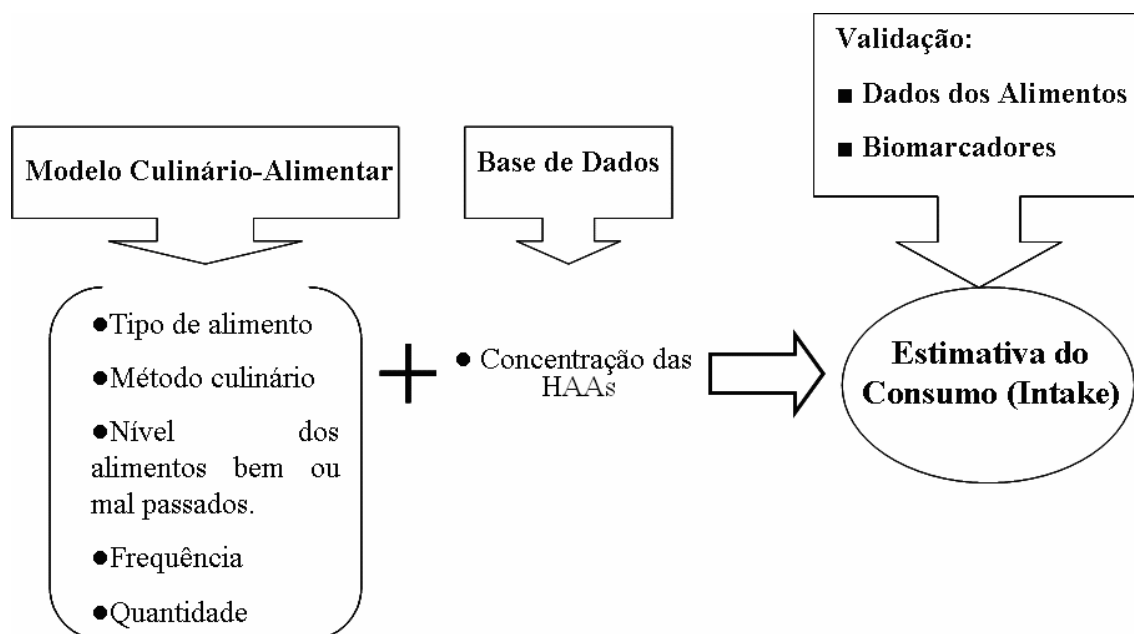


Figura 1.5: Esquema dos métodos utilizados para avaliação da estimativa de HAAs ingeridas numa dieta normal (adaptado de Sinha, 2002).

A presença de HAAs nos alimentos depende da influência de muitos factores, tais como os métodos culinários utilizados, o tempo e temperatura de preparação, a presença de quantidades relativas de agentes precursores, potenciadores e inibidores, lípidos, antioxidantes e da quantidade de água. Em particular, a suplementação com substâncias antioxidantes é considerada uma medida efectiva para reduzir a exposição às HAAs, atendendo à provável intervenção de radicais livres na formação de HAAs. Alguns estudos mostraram que compostos e misturas ricas em antioxidantes inibiam a mutagénese ou carcinogénese induzida pelas HAAs. Analisando o esquema de formação das HAAs representado na figura 2, os antioxidantes podem actuar como inibidores ao longo de diferentes vias de reacção, evitando a formação de mutagénios, através da supressão de radicais principais e eliminação da actividade dos radicais livres (Vitaglione e Fogliano, 2004).

Diferentes estudos publicados indicam que vários antioxidantes são capazes de inibir a formação de HAAs em sistemas químicos, e muitas vezes reduzem a

mutagenicidade/carcinogenicidade induzida pelas aminas em sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo* (Skog *et al*, 2000). Podem destacar-se os antioxidantes sintéticos, o ácido ascórbico, o α -tocoferol, os compostos fenólicos, assim como alguns alimentos, nomeadamente, frutas e vegetais, alimentos ricos em carotenóides e antocianinas, soja, chá e azeite, como tendo importantes propriedades antioxidantes, reduzindo o risco das HAAs (Oguri *et al*, 1998; Vitaglione e Fogliano, 2004).

A necessidade da presença de creatinina na formação de aminas do tipo de HAAs amino-imidazo, significa que estas não são formadas em alimentos proteicos que não contenham estes compostos, incluindo fontes ricas em proteínas como queijo, tofu e feijão, entre outros. Entretanto novas HAAs, como as benzoxazina e furopiridinas, estão a ser descobertas nos nossos dias, possuindo átomos de oxigénio nas suas estruturas.

Foram desenvolvidos vários estudos com o objectivo de determinar a quantidade de HAAs nos diferentes alimentos e segundo o uso de diferentes práticas culinárias. Um desses exemplos está ilustrado na Tabela 1.5, no qual se encontram alguns dos alimentos mais ingeridos e o correspondente teor das principais HAAs.

Tabela 1.5: Quantidade de HAAs em alimentos cozinhados (adaptado de Sugimura *et al*, 2004).

Alimento	Método culinário	HCA (ng/g)							
		PhIP		MeIQx		4,8-DiMeIQx		7,8-DiMeIQx	
		Interior	Pele	Interior	Pele	Interior	Pele	Interior	Pele
Salmão	Grelhado	0,29	5,93	0,10	0,59	0	0	0	4,14
Peixe salgado	Grelhado	0,37	7,00	0,8	0,59	0	9	0	4,46
Bacon	Frito	0,3-4,5	-	nd-23,7	-	0,2-1,4	-	nd	-
Carne de porco	Assado na brasa	4,2	-	0,40	-	0,10	-	nd	-
Peito de frango	Grelhado	27,0-48,0	-	nd-9,0	-	nd-2,0	-	nd	-
Bife	Grelhado	182,0	-	3,0	-	nd	-	nd	-

nd – não detectado

Muitos grupos de investigação têm contribuído para aumentar esta base de dados, recorrendo a informação compilada por diversos autores em artigos de revisão, podendo destacar-se Skog e colaboradores (1998) entre outros. Nestes trabalhos pode verificar-se que o PhIP é a HAA mais abundante aparecendo em quantidades superiores a 480 ng/g de alimento. As concentrações das restantes HAAs são geralmente menores,

variando entre concentrações não detectadas e 15ng/g para a IQ, MeIQ e 4,8-DiMeIQx e até 50 ng/g para a MeIQx.

Skog e Solyakov (2002) compilaram alguns resultados existentes em diferentes estudos científicos, realizados em amostras de frango, concluindo que o PhIP e o MeIQx são as HAAs mais abundantes nos alimentos cozinhados, como já tinha sido apresentado. O PhIP apresenta uma concentração muitas vezes superior a 40 ng/g, seguida da Harman e Norharman, geralmente inferior a 10 ng/g, MeIQx menor que 3 ng/g e as restantes HAAs contêm valores inferiores a 1 ng/g.

Nos trabalhos e estudos publicados é difícil comparar o teor de HAAs em cada alimento, uma vez que os valores podem variar fortemente, devido à diversidade dos alimentos e às diferentes preparações culinárias aplicadas.

O maior problema dos estudos epidemiológicos consiste na obtenção de uma estimativa correcta da exposição às HAAs. Os questionários de frequência alimentar, algumas vezes combinados com imagens de alimentos cozinhados, bem como o estado em que se encontra o alimento, bem ou mal passado, foram usados em estudos epidemiológicos para a estimativa da exposição às aminas. Contudo, nestes questionários verificam-se várias falhas incluindo, relatos inconsistentes, dificuldade na quantificação ao nível de bem ou mal passado pelos diferentes métodos, e a variação da dieta de dia para dia. Como resultado, a estimativa pode não ser correcta e exacta, implicando uma menor probabilidade de encontrar associação entre as HAAs e o aparecimento de cancro. Como o desenvolvimento de cancro pode demorar muito tempo há um atraso de muitos anos entre o período de exposição e o aparecimento da doença (Alexander *et al*, 2002).

De forma a contornar alguns dos problemas relacionados com a interpretação dos questionários, e o seu contributo para a avaliação da exposição das HAAs, foram feitas várias tentativas para desenvolver biomarcadores de exposição. O uso desses biomarcadores podem não responder à estimativa da exposição determinada, se for distanciada vários anos após a ingestão, porque as HAAs são rapidamente eliminadas pelo organismo. Em contraste, as dioxinas possuem uma acumulação nos tecidos adiposos e têm um tempo de meia vida de cerca 7 anos. Assim, as HAAs presentes nos fluidos biológicos ou tecidos podem apenas indicar a quantificação de uma exposição recente. A exposição às HAAs pode variar fortemente de dia para dia, por isso, o biomarcador deve integrar uma exposição ao longo de um determinado período de tempo (Alexander *et al*, 2002).

Os biomarcadores estudados podem ser as próprias HAAs e os seus metabolitos excretados na urina, no entanto, a actividade mutagénica dessas substâncias presentes na urina, não é detectada 12 horas após o consumo de uma refeição com um teor elevado de HAAs. Isto indica que as HAAs presentes na urina possuem um tempo de semi-vida curto, e podem não ser ideais para a medição do consumo (*intake*) a aplicar nos estudos epidemiológicos, especialmente se existe uma variabilidade substancial de dia para dia. Contudo, uma amostragem significativa pode ser usada para validar o consumo de HAAs, estimado pelos inquéritos de frequências alimentares (Sinha, 2002).

A formação de aductos entre as HAAs e as proteínas séricas constituiu um biomarcador que, em contraste com os metabolitos urinários, pode integrar a exposição através de um longo período de tempo, cerca de 30 dias ou mais, dependendo do tempo de meia vida da proteína usada. Os aductos proteicos têm vindo a ser usados com sucesso como biomarcadores para muitos compostos, incluindo aminas aromáticas. Contudo, com HAAs o nível de formação de aductos é muito menor e os aductos resultantes podem também ser instáveis. Este marcador ainda precisa de validação, para poder ser considerado como um biomarcador de exposição nos humanos (Alexander *et al*, 2002).

Estão a ser desenvolvidas novas tecnologias para encontrar biomarcadores a longo termo, como sejam, a formação de aductos com ADN e a acumulação das HAAs no cabelo humano (Sinha, 2002).

Nos últimos anos, vários estudos epidemiológicos realizados sobre algumas populações correlacionaram o consumo de HAAs, com o aparecimento e desenvolvimento diferentes carcinomas humanos (Busquets *et al*, 2004). Na Figura 1.6 está esquematizado um estudo multidisciplinar usado para investigar a relação entre os diferentes tipos de carcinomas, a dieta individual e as diferentes práticas culinárias.

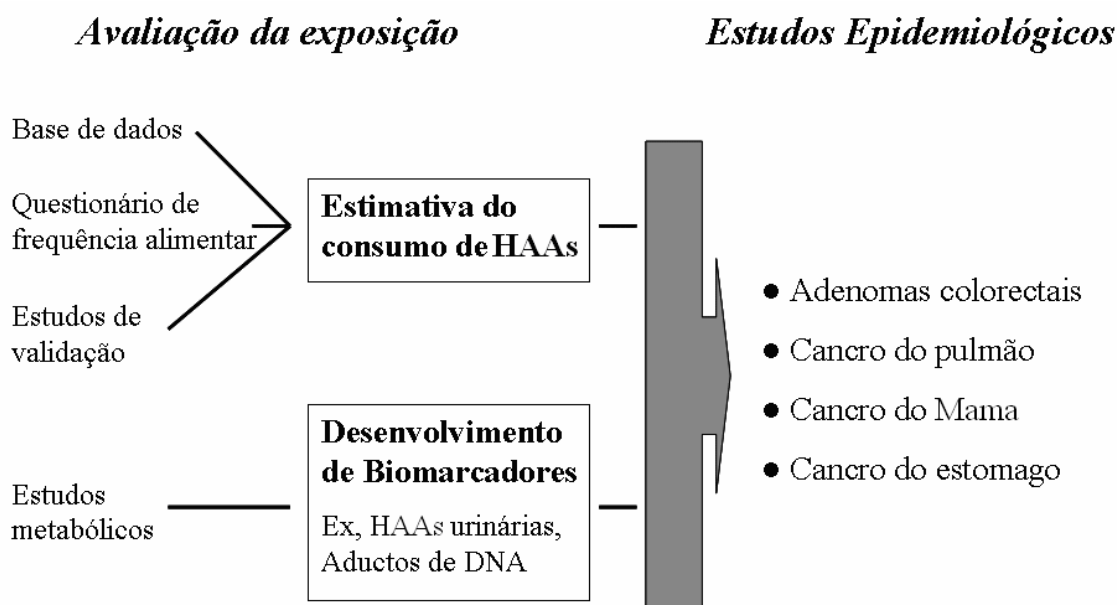


Figura 1.6: Esquema representativo do estudo multidisciplinar usado para investigar a relação dos diferentes tipos de carcinomas, a dieta individual e as diferentes práticas culinárias (adaptado de Sinha, 2002).

Um estudo desenvolvido por Skog e pela sua equipa (1998) reuniu os dados relativos à estimativa do consumo de HAAs descrita na literatura durante os anos de 1991 até 1997. No entanto, esses resultados mostravam alguma discrepância entre si, visto que foram usados diferentes métodos para estimar a quantidade de HAAs ingerida e também diferentes alimentos. Outro estudo desenvolvido por Busquets (2004) refere o consumo de HAAs na dieta espanhola, em que a estimativa aponta para um valor de 606ng de HAAs mutagénicas por pessoa e por dia, sendo o PhIP e o DMIP as duas HAAs mais abundantes.

Diferentes estudos de consumo de HAAs realizados nos Estados Unidos da América, indicam que uma estimativa para o consumo de HAAs num adulto varia entre 6,3 ng/kg por dia até 20,1 ng/Kg por dia, enquanto a estimativa para a população Europeia varia entre 2,3 ng/Kg por dia a 6,6 ng/Kg por dia. Estas estimativas podem reflectir diferenças culturais nas preferências, alimentares e no modo de preparação dos alimentos, evidenciado por um menor consumo de HAAs na população Europeia (Keating e Bogen, 2004). Este facto foi estudado por Sugimura (2004), que através de estudos epidemiológicos demonstrou que o consumo de HAAs pela população

Americana é superior à Europeia, e que o consumo da população Europeia é superior ao da população Japonesa (Tabela 1.6). Esse trabalho também demonstra que a exposição às HAAs tem particular relevância com a incidência de cancro do cólon, e mais especificamente, o PhIP com o cancro da mama.

Tabela 1.6: Consumo diário de HAAs (adaptado de Sugimura, *et al*, 2004).

Estudo	Sujeito	Número	Quantidade	
European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition		344	Mediana	103 ng/dia
Japanese Public Health Center	Homem	18290	Média	66 ng/dia
	Mulher	20745	Média	58 ng/dia
USA, Case (colorectal cancer) control study in Arkansas	Caso	155	Média	364 ng/dia
	Controlo	380	Média	261 ng/dia

1.5 – REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO ÀS HAAS

Entre os diferentes processos que podem ser utilizados para diminuir os níveis de exposição do organismo às HAAs, podem destacar-se:

Reduzir o consumo de carne e de peixe. Estes alimentos constituem a principal fonte de HAAs da dieta. Por essa razão, se a carne se apresentar bem passada devem remover-se as zonas queimadas da carne antes do seu consumo.

Utilizar métodos culinários que minimizem a formação de HAAs. A formação de HAAs depende de diversos factores, tais como, a presença e quantidades relativas de precursores (creatina, aminoácidos livres e açúcares), os métodos culinários e ingredientes utilizados (Johansson *et al*, 1995; Knize e Felton, 2005). Durante a cocção, a temperatura de preparação parece ser mais crítica do que o tempo, ao interferir na formação de amins heterocíclicas (Sinha *et al*, 1998; Skog *et al*, 1998, Solyakov e Skog, 2002; Bordas *et al*, 2004; Warzecha *et al*, 2004; Kikugawa 2004). Deste modo, a

carne frita, grelhada ou assada no churrasco apresenta uma maior quantidade de HAAs do que a carne assada ou cozida. Ao assar no forno, o calor é transferido pelo ar quente, o que significa que a transferência de calor se dá de uma forma menos eficiente. Ao cozer, como a temperatura não excede os 100 °C a quantidade de HAAs formadas é muito baixa ou não detectável. Alguns conselhos práticos indicados para reduzir a quantidade de HAAs consistem em virar frequentemente a carne ao fritar, especialmente, quando está a ser cozinhada a altas temperaturas (Salmon *et al*, 2000; Kikugawa, 2004); evitar o contacto directo da carne com a chama; revestir a carne com folha de alumínio antes da cocção ou cozinhar em microondas durante 1 minuto e rejeitando o caldo que se origina (Wakabayashi e Sugimura, 1998); marinar os alimentos, embora tenha a finalidade de melhorar as características sensoriais, também reduz a formação de HAAs (Tikkanen *et al*, 1996).

Inibir a formação do mutagénio por interacção com compostos que previnem a formação das HAAs a partir dos seus precursores. Os compostos mais estudados para este efeito são o ácido ascórbico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico, o ácido gálico, a N-acetilcisteína, a prolina e a tioprolina, que se pensa que actuem como inibidores dos radicais livres que são gerados nas reacções de Maillard. Os antioxidantes (catequinas, flavonóides, ácido cafeico), os compostos organossulfurados (sulfureto de dialilo, dissulfureto de dialilo) e os aminoácidos têm sido descritos como inibidores da formação de HAAs. O azeite recém produzido, rico em derivados fenólicos, teve um efeito inibidor das HAAs em sistemas modelo, mostrando-se mais eficiente do que um azeite mais antigo, contendo uma menor quantidade de compostos fenólicos. Vários estudos recentes indicam que o BHA adicionado ao bife atenua a mutagenicidade das HAAs formadas após fritura, contudo trabalhos mais recentes sugerem que a actividade do MeIQx está aumentada na presença de BHA e outros antioxidantes. Estes mecanismos ainda não estão devidamente clarificados (Dashwood, 2002).

Interagir directamente com os carcinogénios e mutagénios diminuindo a sua biodisponibilidade. Estas “moléculas interceptoras” podem constituir uma defesa contra as HAAs. Uma das moléculas que pertence a este grupo é a clorofilina, que contém uma estrutura aromática planar, como é o caso das HAAs, tendo uma importante acção de protecção na presença de mutagénios e carcinogénios (Dashwood, 2002). Alguns estudos sugeriram a possibilidade de formação de moléculas complexas entre a clorofila

e as formas activadas das HAAs. No entanto, outros estudos realizados por modelação em computador, indicaram que as forças que estabilizam os complexos formados são forças de van der Waals, entre os anéis das HAAs e o inibidor, assim como, ligações de hidrogénio entre o exociclo da HAAs e os grupos carboxilo da clorofila. Embora estas ligações sejam reversíveis e não covalentes, a extensão da formação do complexo está correlacionada com a capacidade antimutagénica da clorofila contra as HAAs, o que pode ser verificado no ensaio da *Salmonella*. Outros estudos indicam que as fibras presentes na dieta e alimentos fermentados (iogurte e leite fermentado) apresentam uma elevada afinidade para as HAAs, diminuindo a sua carcinogenicidade (Wakabayashi e Sugimura, 1998). Por exemplo, ensaios recentes efectuados em ratos demonstram existir uma redução da carcinogenicidade, após ingestão de fibra de sorgo e trigo, juntamente com MeIQx.

Inibir a activação das HAAs. A activação das HAAs inicia-se com a N-hidroxilação do grupo amino do exociclo, sendo esta reacção catalisada essencialmente pelo citocromo P450 1A2 (CYP1A2), mas tendo também a contribuição do citocromo P450 1A1 (CYP1A1), citocromo P450 1B1 (CYP1B1) e prostaglandina H sintetase (PHS). Vários agentes inibem esta activação como é o caso do indole-3-carbinol (I3C) que está presente na couve, couve-flor e brócolos, e que inibe o citocromo P450. Os polifenóis presentes no chá e a clorofila das plantas atenuam a actividade mutagénica das HAAs no ensaio com *Salmonella*, por inibição competitiva da NADPH citocromo P450 redutase e das HAAs N-hidroxiladas. Outros estudos revelaram que a epigallocatequina-3-galato inibe o CYP1A2 humano que é mediadora da activação do PhIP em *Salmonella* geneticamente modificada (Dashwood, 2002).

Induzir o CYP1A1. Este pode catalisar a hidroxilação das HAAs nas posições do carbono 4' e 5', sendo a molécula resultante, o substrato necessário para acção das as enzimas de fase II que geram conjugados com glucuronídeos e sulfatos que são excretados na urina. A indução da CYP1A1 pode ser um mecanismo de protecção das HAAs, contudo é necessário ter em conta que algumas classes de carcinogénicos podem ser activados por esta enzima (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) (Dashwood, 2002).

Modular as enzimas de fase II. Estas enzimas estão envolvidas no metabolismo das HAAs que incluem a UDP-glucuronosil-transferase (UDPGT), sulfotransferases (SULT) e a glutathione-S-transferase (GST). As formas induzidas da GST podem estar envolvidas na diminuição da toxicidade das HAAs devido à redução, dependente da glutathione, das N-acetoxi- HAAs que podem regenerar o composto original (Dashwood, 2002).

Capturar os compostos electrofílicos. Um dos mecanismos de formação de aductos entre as HAAs activadas e o ADN ocorre via ataque electrofílico com a desoxiguanosina (dG) na posição N-2 e C-8 (Turesky, 2002). Este processo de lesão do ADN pode ser evitado. Por exemplo, os polifenóis do chá, como a epigallocatequina-galato, inibem a actividade mutagénica do N-hidroxi-IQ no teste de Ames/*Salmonella* através da sua captura electrofílica (Dashwood, 2002).

Aumentar os sistemas de reparação. Compostos como a vanilina, a cumarina e a cafeína diminuem a frequência de micronúcleos nos hepatócitos tratados com IQ, PhIP e outras aminas heterocíclicas (Dashwood, 2002).

Agentes supressores. Estes agentes alteram as vias de sinalização que controlam a apoptose e a proliferação celular, através da inibição do sinal de transdução, metabolismo das poliaminas, metabolismo do ácido araquidónico, do aumento da apoptose, da comunicação intracelular e da função imune. Dentro desta classe incluem-se vários polifenóis, retinóides, carotenóides e vitaminas (Dashwood, 2002).

1.6 – INTERACÇÃO ENTRE HAAS E ANTIOXIDANTES

O efeito dos antioxidantes na formação das HAAs tem sido controverso. Johansson e Jagerstad (1996) descreveram que a adição de TBHQ, vitamina C e vitamina E não apresentou quaisquer efeitos antioxidantes no que respeita à formação de MeIQx. No entanto, outros estudos revelaram que as concentrações de HAAs podem ser reduzidas pela adição de compostos com potenciais propriedades antioxidantes. Por exemplo, os polifenóis presentes no chá inibiram, efectivamente, a formação de HAAs em sistemas modelo e em carne cozinhada (Weisburger *et al*, 1994; 2002).

Foram estudados diversos aditivos alimentares que minimizam a formação de HAAs em sistemas modelo e em amostras de carne cozinhada. O disulfureto de dialilo e disulfureto de dipropilo, componentes minoritários da cebola, previnem a formação de HAAs em amostras de sumo de carne de porco cozido (Tsai *et al*, 1996). Os compostos de enxofre presentes no alho também apresentaram propriedades inibitórias na formação de HAAs (Shin *et al*, 2002a,b). As concentrações de HAAs e a mutagenicidade provocada pela carne triturada e frita pode ser reduzida pela adição de substâncias, tais como, polpa de cereja (Britt *et al*, 1998), especiarias antioxidantes (Murkovic *et al*, 1998), vitamina E (Balogh *et al*, 2000) e méis uniflorais (Shin *et al*, 2003). O efeito do azeite virgem recém-preparado, rico em derivados dihidroxifeniletanol, na formação de HAAs em sistemas modelo aquosos contendo glucose, glicina e creatinina foi avaliado (Monti *et al*, 2001). O azeite virgem recente inibiu (entre 30 a 50%) a formação de HAAs quando comparado com o azeite controlo (amostra com um ano).

O ascorbato e o eritorbato quando presentes em doses de 0,33% (m/m) foram efectivos na redução de aproximadamente 50% da mutagenicidade em amostras de hamburgers cozinhados (Kato *et al*, 2000). O sabor do alimento não foi afectado por cozinhar recorrendo ao ascorbato e eritorbato nestas doses.

Alguns autores demonstraram o efeito inibidor dos carotenóides presentes no tomate (Vitaglione *et al*, 2002) e da adição de pequenas quantidades de fibra de cereais ou de amido da batata (Persson *et al*, 2004), na formação de HAAs em amostras de bife triturado.

Gibis (2007) também avaliou a possibilidade de reduzir a formação de HAAs nas amostras de bife triturado, usando no entanto, diferentes marinadas com alho, cebola e sumo de limão, em que foram determinados os níveis óptimos dos

componentes a adicionar à marinada. As correspondentes características sensoriais foram avaliadas com recurso a um painel treinado, concluindo que o alho e em menor extensão a cebola, mostraram um efeito inibitório na formação de MeIQx e 4,8-DiMeIQx.

Busquets *et al* (2006) avaliaram a formação de HAAs resultante do efeito de marinadas preparadas com vinho tinto aplicados a filetes peito de frango e fritos a 220 °C durante 5 min, de cada um dos lados. Para esta experiência foram usados três vinhos com diferente composição. Verificou-se que o uso da marinada de vinho contribuiu para a redução da formação de PhIP, uma das aminas mais abundantes nas amostras de carne. Os três vinhos testados para a marinada reduziram o conteúdo de PhIP de 72 ng/g presentes na fracção de carne de frango não marinada para 8-12 ng/g encontrados na fracção de carne marinada, o que corresponde a uma diminuição aproximada de 83-88%. Uma redução pronunciada de PhIP foi também observada num outro estudo (Salmon *et al*, 2006), em que foi usada uma marinada contendo uma mistura de vários ingredientes (azeite, açúcar castanho, vinagre de cidra, sumo de limão, alho triturado, sal e mostarda) antes de fritar.

1.7 – EXTRACÇÃO DAS HAAS E PURIFICAÇÃO DOS EXTRACTOS

A complexidade da matriz do alimento, a baixa quantidade de HAAs presente e a necessidade de vários passos de isolamento para eliminar os interferentes, faz com que a extracção das HAAs seja difícil (Skog *et al*, 1998). No entanto, têm sido desenvolvidos diversos métodos de extracção e purificação de HAAs, baseados em processos de extracção líquido-líquido (LLE) (Tikkanen *et al*, 1996), extracção com Blue rayon (Murkovic *et al*, 1998), extracção em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos descartáveis (Richiling *et al*, 1998) e processos que associam LLE e SPE (Gross, 1990; Gross e Grüter, 1992).

A homogeneização da amostra é realizada utilizando diferentes solventes, nomeadamente, metanol, acetona, acetato de etilo, misturas hidroalcoólicas, ou solventes aquosos, tais como água, ácidos clorídrico, ou hidróxido de sódio (Knize *et al*, 1997; Toribio *et al*, 2000).

Extracção Líquido-Líquido (LLE). É o método de separação preferido pela maioria dos autores, para efectuar a primeira etapa no isolamento das HAAs através da matriz do alimento. A extracção líquido-líquido pode ser realizada utilizando um suporte sólido inerte de um determinado material, por exemplo, a terra de diatomáceas. Este suporte sólido é recomendado para amostras homogeneizadas em solução de hidróxido de sódio, em que a fase aquosa se distribui sob a forma de uma fina camada rodeando a matriz inerte e as macromoléculas, tais como proteínas e glúcidos, permanecendo adsorvidas no material inerte (Toribio *et al*, 2000).

Extracção em fase sólida. O método mais utilizado é o método de Gross que associa a extracção LLE e utiliza a terra de diatomáceas como suporte sólido, e duas etapas de SPE com ácido propilsulfónico (PRS) e colunas C18, obtendo-se dois extractos. O primeiro extracto obtido contém as HAAs apolares Trp-P-1, Trp-P-2, AαC e MeAαC e a PhIP e o outro resultante da segunda fracção contém as aminas polares DMIP, IQ, MeIQ, MeIQx e 4,8 DiMeIQx (Gross e Grüter, 1992). Este método foi usado como ponto de partida por outros autores, para efectuarem alterações e optimizações (Toribio *et al*, 2002). Actualmente, o método de Gross modificado é recomendado para a análise

das HAAs em extractos de carne (Santos *et al*, 2004), e frequentemente utilizado em ensaios interlaboratoriais. Este procedimento encontra-se resumido na Figura 1.7.

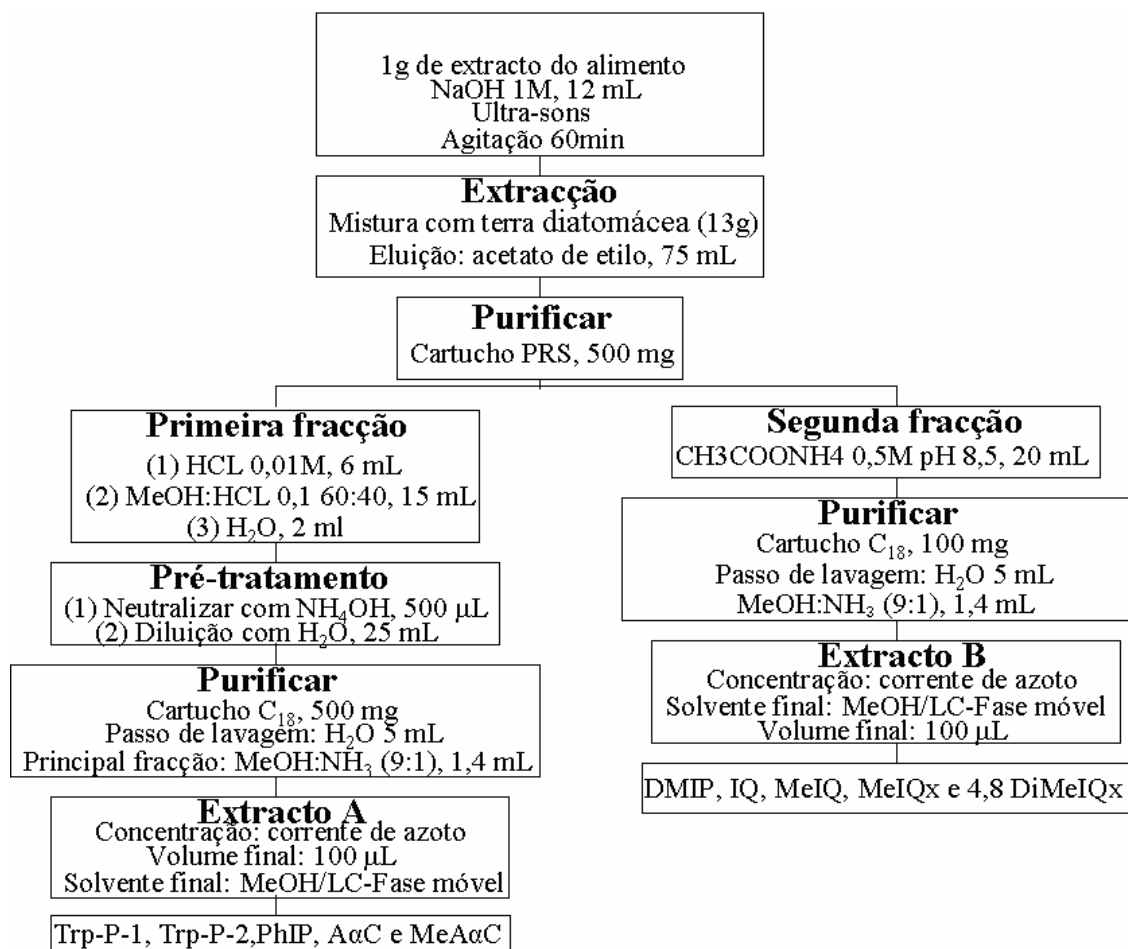


Figura 1.7: Esquema do procedimento de extracção e purificação recomendado para a análise de HAAs nos alimentos (adaptado de Santos *et al*, 2004).

A amostra alcalinizada com hidróxido de sódio é colocada numa coluna Extrelut, que se encontra acoplada a uma coluna de PRS 500 mg (ácido propanosulfónico). Após eluição das HAAs com acetato de etilo, para recolher a primeira fracção de aminas a partir da coluna de PRS, esta é lavada com uma solução de ácido clorídrico, que activa o processo de troca iónica, e depois com uma solução de metanol/ácido clorídrico e água. A solução resultante é neutralizada, passando seguidamente numa coluna Bond Elut C₁₈ 500 mg. Finalmente, as espécies a analisar são eluídas com metanol/amónia. A segunda fracção é obtida a partir da coluna PRS por

elução com acetato de amónio a pH 8. Seguidamente passa através de uma coluna C₁₈ 100 mg, onde após lavagem, as HAAs polares adsorvidas são eluídas utilizando uma mistura metanol/amónia. O primeiro extracto contendo as aminas apolares e o segundo extracto contendo as aminas polares são evaporados em corrente de azoto e reconstituídos com 100 µl de metanol/fase móvel (Santos *et al*, 2004).

Mais recentemente, Toribio *et al*, (2007) propuseram um método mais rápido extracção das HAAs das amostras de carne através de um único extracto. O processo baseia-se na associação entre a extracção líquido-líquido e a extracção em fase sólida, usando cartuchos contendo ácido propilsulfónico e colunas C₁₈. A técnica de cromatografia líquida com espectrometria de massa foi usada para a quantificação, e identificação dos picos cromatográficos. Os referidos autores compararam os resultados obtidos utilizando esta metodologia na análise de amostras de bife grelhado, com os resultados obtidos para o mesmo tipo de amostras, mas utilizando o método de Gross modificado (Santos *et al*, 2004) tendo obtido resultados concordantes.

Outros adsorventes selectivos para a extracção de HAAs são referidos na literatura, incluindo o *Blue cotton* que é constituído por fibras de algodão ligadas covalentemente ao pigmento ftalocianina de cobre tiosulfato e que forma complexos com moléculas poliaromáticas planares tais como as HAAs. O *Blue rayon*, é formado por um conjunto de fibras inertes de rayon ligadas covalentemente ao mesmo pigmento, ftalocianina de cobre tiosulfato, contendo 2-3 vezes mais ligantes (aproximadamente 30 µmol/g peso seco) que o *Blue cotton* (10 µmol/g peso seco) (Hayatsu *et al* 1996; Skog 2004; Kummrow & Umbuzeiro 2006; Murkovic 2007). Nestas substâncias, a adsorção ocorre em meio aquoso envolvendo a formação de um complexo entre o ligando e o composto aromático. A desorção pode ser realizada por eluição com solventes orgânicos, sendo a mistura de metanol e amónia, geralmente a mais eficiente. O *Blue chitin*, uma poli-N-acetilglucosamina ligada covalentemente à ftalocianina de cobre tiosulfato, também é usado em colunas de SPE para extracção e concentração de HAAs de diversas matrizes (Hayatsu *et al*, 1996; Bang *et al*, 2002, 2004). Estas colunas são menos dispendiosas e permitem obter recuperações mais elevadas, para os compostos com mais de três anéis aromáticos (Alaejos *et al*, 2008).

Molecular imprinted polymers. Os materiais mais promissores na área dos sistemas artificiais de reconhecimento molecular são designados “*molecular imprinted polymers*” (MIPs). Estes materiais têm o objectivo de produzir locais de ligação quimicamente

selectivos, capazes de reconhecer uma molécula particular, numa matriz polimérica macroporosa, como resultado de por interacções não covalentes (ligações de hidrogénio e interacções iónicas) ou interacções covalentes reversíveis (Murkovic, 2007). Um material deste tipo com selectividade para o PhIP e outras HAAs foi preparado a partir de pentaeritriol tetra-acrilato e ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS) com PhIP como molécula “a imprimir”. Após polimerização o PhIP é extraído e o polímero resultante pode ser usado como material SPE. A selectividade e especificidade do adsorvente são baseadas na interacção iónica entre o monómero funcional (AMPS) e o PhIP, no arranjo dos monómeros à volta da molécula alvo. Ao contrário do que acontece com o material de SPE convencional, este polímero pode ser usado repetidas vezes. No entanto, este material ainda não está comercialmente disponível (Murkovic, 2007).

Microextração em fase sólida. A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração relativamente recente, introduzida por Pawliszyn e seus colaboradores. Esta técnica de SPME integra a amostragem, a extração, a concentração e a introdução da amostra num sistema analítico adequado. Deve realçar-se como factor importante, a não utilização de solventes orgânicos durante a extração, eliminando assim algumas das desvantagens apresentadas anteriormente (Zambonin, 2003). O princípio do SPME é baseado no equilíbrio das espécies a analisar, entre a matriz da amostra e uma fase orgânica polimérica, normalmente ligada a uma fibra de sílica, sendo a quantidade de compostos absorvidos pela fibra directamente proporcional à concentração inicial dos compostos presentes na amostra (Alaejos *et al*, 2008).

A maior parte das aplicações da técnica de SPME foram desenvolvidas em combinação com cromatografia gasosa (GC), contudo, esta limita-se à análise de compostos voláteis, termicamente estáveis ou resultantes da sua derivatização. De forma a aplicar a técnica SPME a compostos não voláteis, como é o caso das HAAs, e outros compostos termicamente instáveis foi combinada a SPME com HPLC e CE.

Um método de SPME-HPLC acoplado a um sistema de detecção por fluorescência foi recentemente desenvolvido para a detecção das HAAs apolares (Martín-Calero *et al*, 2006). As espécies a analisar são extraídas da amostra à qual se adiciona uma solução de metanol/NaOH e se coloca durante 4,5 minutos, num sistema de ultrasons para completa homogeneização. Seguidamente procede-se à concentração

da amostra numa fibra de SPME Carbowax-Templated Resin (CW-TPR), que é imersa directamente no extracto da amostra de carne.

1.8 – SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS HAAS

Durante algum tempo, a determinação das HAAs era efectuada através da estimativa da actividade mutagénica obtida pelo resultado do ensaio de Ames (Skog *et al*, 1998). Actualmente, essa determinação é efectuada utilizando diferentes métodos, como a cromatografia líquida de alta-resolução (HPLC) com detecção ultravioleta (UV), electroquímica, fluorescência ou espectroscopia de massa (LC-MS); a cromatografia gasosa (GC) com detecção por espectroscopia de massa (GC-MS); a electroforese capilar (CE) e ensaios imunoadsorventes com enzima ligada (ELISA) (Kataoka, 1997).

Cromatografia líquida de alta-resolução (HPLC). A técnica de HPLC é uma das técnicas analíticas mais populares para a detecção das HAAs, sendo utilizada com diferentes detectores. Todas as HAAs têm espectros característicos no UV, elas no entanto, também são oxidáveis electroquimicamente e algumas (menos polares e PhIP) são fluorescentes em solventes polares. Assim, estes compostos podem ser analisados com detectores UV, electroquímicos, florescentes e espectroscopia de massa (MS).

A detecção por absorvência no UV é o método mais popular para a monitorização do efluente das colunas de HPLC, e a maioria das HAAS podem ser detectadas simultaneamente na região dos 260-275 nm. A sensibilidade é mais baixa do que na detecção por fluorescência, mas tem a vantagem de, no caso de utilizar detector de díodos, permitir a imediata identificação das espécies a analisar por correlação espectral. O limite de detecção destes compostos varia entre 0,02-50 ng/g (Kataoka, 1997; Ristic *et al*, 2004; Alaejos *et al*, 2008).

A detecção por fluorescência é frequentemente usada para a análise das HAAs do tipo pirolítico e PhIP, porque as HAAs como o IQ, MeIQ e MeIQx não possuem fluorescência. Geralmente é usada como um complemento da detecção por díodos, de modo a eliminar as interferências observadas na detecção UV. O limite de detecção da Trp-P-1, Trp-P-2, PhIP, AαC e MeAαC varia entre 0,03-3 ng/g. Uma boa separação das HAAs é conseguida modificando o pH de 3,2 para 7,0 e alternando o gradiente do eluente através de uma concentração crescente de acetonitrilo de 15% para 30% (v/v). Foram testadas diversas colunas de sílica tendo-se obtido picos mais simétricos e maior eficiência de separação, com a coluna TSK gel ODS e a utilização de um gradiente

ternário que origine a alteração do pH de 3.2 para 3.6 durante a separação cromatográfica (Pais e Knize, 2000; Ristic *et al*, 2004; Alaejos *et al*, 2008).

A detecção electroquímica das HAAs é baseada no potencial de oxidação destes compostos, e assim, a escolha dos instrumentos, do eléctrodo material e a composição da fase móvel são factores que influenciam a sensibilidade e a selectividade, deste sistema de detecção. A eluição isocrática é normalmente usada com o HPLC e detecção electroquímica, atendendo a que a eluição por gradiente não pode ser usada, devido à grande variação da sensibilidade deste detector. Deste modo, é difícil a análise de todas as HAAs em apenas um ensaio. A selectividade da detecção electroquímica resulta do facto das HAAs serem oxidadas a potenciais menores que outros compostos, o que torna a sua selectividade tão importante como a sensibilidade. A maioria das impurezas detectadas no UV não é oxidada no potencial de trabalho, o que permite a detecção das HAAs sem interferências (Kataoka, 1997; Pais e Knize, 2000; Bermudo *et al*, 2005).

A detecção por LC-MS combina as vantagens da separação por HPLC associada à elevada sensibilidade e selectividade proporcionada pela espectroscopia de massa. O espectrómetro de massa funciona essencialmente como um detector específico da massa molecular, em que os níveis de interferência para uma amostra de matriz complexa são reduzidos relativamente ao sistema de detecção por espectroscopia de UV, conduzindo a uma diminuição do tempo dispendido e do trabalho necessário para os procedimentos de pré-tratamento da amostra. Consequentemente LC-MS é um dos melhores sistemas de identificação usados actualmente, devido à sua boa selectividade e elevada sensibilidade. Durante a última década foram feitos aperfeiçoamentos da metodologia (LC-MS) possibilitando a aplicação desta técnica para a detecção e quantificação das HAAs. Os problemas derivados de uma purificação mais simples da matriz são resolvidos com HPLC-MS (Holder *et al*, 1997).

Podem ser usadas três técnicas de ionização: *termospray* (TSI), *electrospray* (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI). A sensibilidade da espectrometria de massa pode ser aumentada seleccionando alguns iões em vez do espectro completo, como ocorre no modo de monitorização por ião (SIM).

O processo de ionização *termospray* em LC-MS produz uma abundância de iões pseudo-moleculares para esta classe de compostos, e os picos de base nos espectros de massa são detectados segundo a forma $[M+H]^+$. As HAAs são estáveis no processo de ionização e não ocorre fragmentação notável. A monitorização do ião $[M+H]^+$ da respectiva HAAs, pode ser usada na análise de matrizes complexas (Kataoka, 1997;

Alaejos *et al*, 2008). APCI tem a vantagem de apresentar maior sensibilidade (Alaejos *et al*, 2008).

O LC-MS *electrospray* é constituído por uma ligeira interface de ionização, e apresenta-se como uma ferramenta poderosa para a análise de constituintes vestigiais em amostras de uma matriz complexa, com um baixo peso molecular. O processo de *electrospray* em LC-MS pode efectivamente transformar as HAAs da solução em iões protonados na fase gasosa. Como resultado, as HAAs originam um único espectro de massa simples, em que o único pico é devido ao ião $[M+H]^+$. Estes compostos são estáveis para o processo de ionização e não se verifica fragmentação significativa, excepto para IQ e 4,7,8-TriMeIQx, que apresentam um fragmento $[MH - 15]^+$ (Galceran *et al*, 1996; Kataoka, 1997; Barceló-Barrachina *et al*, 2004a, 2004b, Alaejos *et al*, 2008).

A ionização *electrospray* também pode ser usada em combinação com *tandem mass spectrometry* (MS-MS) permitindo aumentar a sensibilidade da detecção, e a obtenção de cromatogramas praticamente livres de interferentes (Barceló-Barrachina *et al*, 2006).

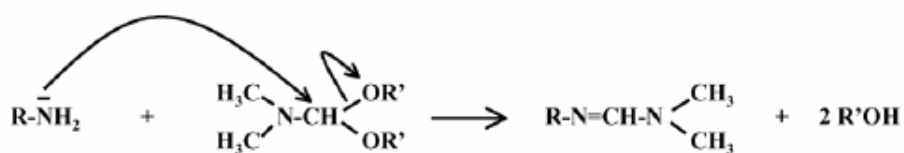
Cromatografia gasosa (GC). Durante a análise efectuada por cromatografia gasosa (GC), a maioria das HAAs são polares e pouco voláteis e tendem a eluir sob a forma de picos largos e com *tailing*, devido a uma forte adsorção à coluna e ao injector (Kataoka, 1997; Pais e Knize, 2000; Alaejos *et al*, 2008). A derivatização das HAAs torna-se então necessária, devendo ser efectuada não só para reduzir a polaridade da amostra mas também, para melhorar a sua volatilidade, selectividade, sensibilidade e separação das aminas. Assim, nos últimos anos foram propostos, vários métodos de derivatização. O método mais amplamente usado tem sido a alquilação dos grupos amino primários, através do reagente brometo de 3,5-bistrifluorometilbenzilo (bis-TFMBZ-Br), que lhe conferem uma alta sensibilidade. Contudo os produtos de derivatização originados são uma mistura de formas mono- e di-alquilos e apenas algumas HAAs podem ser efectivamente derivatizadas (Barceló-Banachina *et al*, 2005).

Outro reagente proposto é o anidrido heptafluorobutírico que realiza uma reacção de acetilação, e que tradicionalmente era usado para derivatizar aminas aromáticas. No entanto, devido à acidez dos aminoimidazoarenos acetilados este método não se mostrou apropriado. Então, de forma a contornar este problema, vários

laboratórios recomendaram a realização de um segundo passo de derivatização, após a acetilação, que consistia na metilação do grupo amino através do reagente diazometano, dimetilforamida ou dimetilacetal. Contudo, este método de derivatização apenas pode ser usado com algumas HAAs (Barceló-Banachina *et al*, 2005).

O uso do reagente dimetilacetal N,N-dimetilformamida (DMF-DMA), possibilitou uma eficiente derivatização e a análise simultânea de um grande número de HAAs em diferentes tipos de amostras. A derivatização com DMF-Alquilos é o resultado da reacção com o grupo amino, baseada na condensação da base de Schiff das aminas primárias. Por esta razão, é considera-se que cada HAA origina um único derivado pela reacção com os compostos DMF-Alquilos (Kataoka e Kijima, 1997; Alaejos *et al*, 2008). Efectuou-se um estudo comparativo de diferentes processos de derivatização das HAAs baseados na formação de bases de Schiff e usando reagentes dialquilacetals N,N-dimetilformamida. As respectivas reacções de derivatização estão esquematizadas na Figura 1.8. Entre os diferentes reagentes derivatizantes, seleccionando-se o di-*tert*-butil acetato N,N-dimetilformamida porque apresenta maior rendimento da reacção e maior sensibilidade em análise por GC-MS.

A sililação é provavelmente o método de derivatização mais usado em GC, envolvendo a deslocação de um hidrogénio ácido das HAAs com um grupo sililo após ataque nucleofílico. A introdução do grupo silil permite aumentar a volatilidade e a estabilidade e melhorar as propriedades de espectrometria de massa. Consequentemente, a derivatização da amostra baseada numa única reacção com N-metil-N-(*tert*-butil-dimetil-silil)trifluoroacetamida, para posterior análise de HAAs por GC-EI-MS com quantificação por SIM, permite obter espectros de massa fáceis de interpretar devido à presença do ião $[M-57]^+$ por perda do grupo *tert*-butil-dimetil-sililo (Casal *et al*, 2004).



$\text{R}': \text{CH}_3,$	Dimetilacetal N,N-dimetilformamida, DMF-DMA
$\text{R}': \text{CH}_2\text{CH}_3,$	Dietilacetal N,N-dimetilformamida, DMF-DEA
$\text{R}': \text{CH}(\text{CH}_3)_2,$	Düisopropilacetal N,N-dimetilformamida, DMF-DIPA
$\text{R}': \text{C}(\text{CH}_3)_3,$	Di-tert-butil acetato N,N-dimetilformamida, DMF-DtBA

Figura 1.8: Reacção entre uma HA e o diaquilacetal N,N-dimetilformamida através da substituição nucleófila do grupo amino primário por um grupo acetal (adaptado de Barceló-Banachina *et al.*, 2005).

A cromatografia gasosa com detecção por espectroscopia de massa (GC-MS) é uma das técnicas mais utilizadas para a detecção das HAAs, devido à sua elevada selectividade e sensibilidade, apresentando limites de detecção de na ordem de 0,5-1pg. A GC-MS, idealmente, combina as vantagens da grande resolução fornecida pela cromatografia gasosa capilar, com a grande sensibilidade e selectividade do detector de MS. A espectroscopia de massa por ionização química possui como vantagem a produção de uma menor fragmentação dos compostos, permitindo uma maior possibilidade dos iões moleculares estarem presentes, o que pode ajudar a interpretação. A ionização química com formação do ião negativo (NICI) é bem conhecida como sendo altamente sensível e selectiva para a captura electrónica de compostos (Kataoka, 1997).

A técnica de GC-MS tem sido descrita como a técnica mais sensível na análise de HAAs em alimentos, no entanto a maioria dos métodos não têm grande aplicação devido ao limitado número de métodos multiresíduo (Pais e Knize, 2000).

A GC-MS usualmente pode operar em dois módulos, designados por monitorização de iões totais e monitorização de ião seleccionado (SIM). Para a detecção em SIM apenas os picos de base são escolhidos para obter uma maior sensibilidade (Kataoka, 1997).

Electroforese capilar (CE). A electroforese capilar (CE) é capaz de permitir uma maior eficiência de separação, usar menor quantidade de solventes orgânicos e requer pequenas quantidades de amostra, quando comparado com o HPLC (Puignou et al 1997; Pais e Knize, 2000). O comportamento dos compostos ionizados está dependente de vários factores, como o pH do tampão, modificadores orgânicos, concentração da solução tampão, temperatura do tubo capilar e força do campo eléctrico. A electroforese pode ser usada com diversos detectores, incluindo UV, díodos, electroquímico e fluorescência, sendo este último, apenas eficiente para as aminas menos polares (Alaejos *et al*, 2008). Um método CE para a determinação das HAAs foi desenvolvido por Wu *et al*, (1995), onde grande parte das HAAs foram separadas eficientemente e apresentando um limite de detecção que varia entre 35-50 ng/g. Contudo é necessária uma optimização sistemática, pois as condições óptimas estão restringidas pelas condições experimentais, que se fazem sentir em cada momento (Kataoka, 1997).

Ensaio imunoadsorventes com enzima ligada (ELISA). Os imunoenaios baseados em anticorpos monoclonais e policlonais foram desenvolvidos para pequenos carcinogénicos orgânicos, como por exemplo, os pesticidas, os tóxicos químicos e os aductos do ADN. Estes implicam a produção de anticorpos para as HAAs. O local e o tipo de conjugação são importantes, porque eles influenciam a especificidade da produção dos anticorpos. Encontram-se desenvolvidos dois tipos gerais de anticorpos: os que são específicos para um determinado composto (como, por exemplo, a diferenciação de IQ de todos os outros aminoimidazoarenos), e aqueles que são específicos de uma determinada classe (por exemplo, todos ou a maior parte dos aminoimidazoarenos), pois, na base dos aminoimidazoarenos existe em comum um anel aminoimidazo e um anel de quinolina, quinoxalina ou piridina. Pelo uso destes anticorpos foi estabelecido um ensaio de ELISA sensível e selectivo para IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx e PhIP. Contudo, quando esta técnica é usada para a análise directa destas HAAs ocorrem interferências de outras substâncias, através de reacções cruzadas e por isso a quantificação destes compostos em matrizes complexas não foi possível (Kataoka, 1997).

A Tabela 1.7 resume os métodos, mais comumente, utilizados na identificação e quantificação das HAAs nos alimentos cozinhados.

Tabela 1.7: Métodos de identificação e quantificação das HAAs (adaptado de Skog, 2002).

Método	Detector	Limite de detecção (ng/g)	Vantagens	Desvantagens
HPLC	UV-diode array (UV-DAD)	0,02 – 50	Identificação de pico e homogeneidade	
	Fluorescência (FLU)	0,03 – 3	Alta sensibilidade	Sem confirmação de pico, apenas as HAAs menos polares são fluorescentes
	Electroquímico (ED)	0,05 – 2	Boa sensibilidade e selectividade	Sem confirmação de pico, condições isocráticas
	Espectroscopia de masa (MS)	0,01 – 2	Alta sensibilidade e especificidade	
GC	MS	0,01 – 0,2	Capilar de GC promove alta eficiência de separação	Precisa usualmente de derivatização
CE	UV, ED, MS	35 – 50	Grande eficiência de separação, baixo custo de operação	Preparação da amostra com grande enriquecimento
ELISA		1	Simples	Anticorpos monoclonais estão disponíveis apenas para um número limitado de HAAs

Quantificação das HAAs. A eficiência analítica da extracção das HAAs é sempre menor que 100% as quantidades detectados têm que ser corrigidas devido às baixas recuperações conseguidas. A utilização de um único padrão interno não é o ideal porque as HAAs incluem diferentes classes de compostos, que são extraídos com diferentes graus de eficiências. Um estudo publicado refere que dentro da mesma classe de compostos existem diferenças significativas na percentagem de recuperação da extracção (Pais e Knize, 2000). A composição da amostra tem grande influência na eficiência da extracção, deste modo, o método da adição de padrões é o mais adequado para quantificar as HAAs, permitindo que a recuperação de cada HAAs seja realizada individualmente. A realização de múltiplas extracções, com diferentes aliquotas de cada amostra, fortificadas com diferentes concentrações de padrão permite obter os valores finais de concentração de cada HAAs. A quantificação utilizando isótopos deuterados, SIM GC-MS ou LC-MS reduz o número de amostras a ser extraídas por ensaio atendendo a que a eficiência da extracção é calculada na mesma análise (Pais e Knize, 2000). A desvantagem desta técnica resulta do facto de não existirem padrões deuterados para todas as HAAs e serem muito dispendiosos.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – PADRÕES E REAGENTES

Para a realização do presente trabalho os compostos estudados foram 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]quinolina (IQ), 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina (IQx), 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-*f*]quinolina (MeIQ), 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina (4,8-DiMeIQx), 2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina (7,8-DiMeIQx), 2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina (TriMeIQx), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-*b*]piridina (PhIP), 3-amino-1,4-dimetil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1), 3-amino-1-metil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2), 2-amino-9*H*-pirido[2,3-*b*]indole (AαC) 2-amino-3-metil-9*H*-pirido[2,3-*b*]indole (MeAαC), 2-amino-6-metildipirido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1), 2-amino-dipirido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-2), adquiridos à Toronto Research Chemicals, (North York Ontario, Canada). As soluções padrão de 100 µg/ml foram preparadas em metanol e usadas para posteriores diluições.

Utilizou-se metanol, acetonitrilo e diclorometano (DCM) com um grau de pureza específico para HPLC e adquirido à Merck (Darmstadt, Alemanha). Os reagentes usados para extracção das HAAs (hidróxido de sódio, ácido clorídrico, acetato de amónio) e para a fase móvel, a trietilamina, foram de grau pró análise e também adquiridos à Merck.

A correcção do pH das soluções tampão foi conseguida usando um eléctrodo de vidro associado a um medidor de pH (MicroPH 2001, da Crison, Barcelona, Espanha). As soluções foram filtradas através de uma membrana de nylon com 0,2 µm de tamanho de poro (Teknokroma, Barcelona, Espanha) antes de serem injectadas no sistema de HPLC.

Na homogeneização das amostras foi utilizado o aparelho agitador de vortex (modelo Vortex Mixers VV3 da (VWR)) e um banho de ultrassons (modelo Ultrasonic Cleaner Economic Series da Fungilab SA).

Os cartuchos de Extrelut[®] e o material de enchimento Extrelut[®] HM-N terra de diatomáceas foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). Os cartuchos Bond Elut PRS (500 mg) e Bond Elut C₁₈ (100 e 500 mg) foram adquiridos à Varian (Harbor

City,EUA). Os dispositivos Visiprep e o distribuidor de vácuo Visidry SPE vacuum (Supelco, Gland, Switzerland) foram utilizados para a manipulação dos cartuchos na extracção de fase sólida e evaporação do solvente respectivamente.

As amostras foram evaporadas num sistema de evaporação com aquecimento (Reactive VapTM acoplado Reacti- ThermTM heating module da Pierce).

A extracção das HAAs por SPME foi realizada com o auxílio de uma centrífuga Eppendorf 5810R (Hamburg, Alemanha) e uma placa de alumínio electromagnética com aquecimento (modelo F60, FALC Instruments Treviglio, Itália). O dispositivo de SPME é constituído por um suporte para fibras de SPME para HPLC e uma interface SPME/HPLC com uma válvula de 6 portas Rheodyne® (Supelco,EUA). A fibra de micro extracção utilizada foi uma Carbowax-templated (CW-TPr 50 µm) (Supelco,Belfonte, PA, EUA).

Na marinada das amostras foi utilizado um vinho Região: DOC Douro; Castas: Tinta Roriz, Touriga Nacional e Touriga Franca. Para a marinada em cerveja foi utilizada cerveja do tipo Pilsner (4% álcool, fabricada com água, malte, cereais não maltados e lupo).

2.2 – AMOSTRAGEM

As amostras de carne usadas no presente trabalho foram obtidas do músculo *Longissimus dorsi* de novilho e adquiridas num talho da cidade do Porto. A gordura e o tecido conjuntivo (epimísio) foram removidos.

A amostra foi dividida em dois grupos. Um grupo sujeito a condições de processamento caseiro e outro grupo processado em condições laboratoriais definidas.

2.2.1 – Pratos de carne preparados de acordo com as condições normais de confecção culinária (assar no forno, grelhar e fritar) em casa, a dois níveis diferentes “mal ou bem passado”.

Foram utilizados como amostras, dois pedaços de carne paralelepipediformes, com pesos de aproximadamente 500 g. Às duas porções de carne foram adicionados os seguintes ingredientes, normalmente utilizados na Gastronomia Portuguesa, sal, alho, vinho, tomate, cebola e azeite. As amostras foram assadas num forno eléctrico, a uma temperatura de 250 a 260°C, monitorizadas com um termómetro.

As amostras de carne para grelhar e fritar foram cortadas manualmente em forma de bife (cerca de 1,0 cm de espessura), com dimensões semelhantes e um peso unitário entre 90 a 100 g.

No processamento através da grelha, seis bifes foram grelhados num grelhador metálico, sem adição de azeite ou de qualquer outra gordura. A temperatura foi monitorizada com um termómetro à superfície e variou entre os 180 e os 200°C. Outros seis bifes foram fritos em azeite numa frigideira, tendo a temperatura variado entre os 160 e os 180°C. Estes dois métodos foram realizados em condições de cocção caseira, como tal, foram adicionados, 10 minutos antes da confecção, ingredientes comumente utilizados nos pratos de carne portugueses, nomeadamente o sal, o alho e o vinho. A fonte de calor usada foi um bico de fogão a gás.

As amostras de carne foram sujeitas a dois níveis diferentes de cocção, “mal passado” e “bem passado”, para tal, variou-se o tempo de confecção culinária, consoante o grau de processamento desejado na experiência:

- grelhado ou frito por 4 minutos (2 minutos de cada lado); a cor da carne à superfície apresentou-se clara e no centro vermelha, a perda de peso variou entre 15 e 20%;

- grelhado ou frito por 8 minutos (4 minutos de cada lado), a cor da carne à superfície apresentou-se escura e no centro ligeiramente acastanhado; a perda de peso variou entre 35 e 50%;

- assado no forno por 30 minutos, a cor da carne à superfície apresentou-se clara e no centro era vermelho; a perda de peso variou entre 20 e 25%.

- assado no forno por 70 minutos, a cor da carne à superfície apresentou-se castanha e no centro vermelho; a perda de peso variou entre 38 e 42%.

O grau de processamento culinário foi avaliado pela cor das porções de carne, tanto à superfície como ao centro, e foi classificado em “bem passado” e “mal passado”. As amostras foram cortadas e trituradas com o auxílio de uma picadora e armazenadas à temperatura de -20 °C, para posterior análise. Condições similares às anteriormente descritas, foram adoptadas para a carne sem ingredientes (amostras controlo), apenas utilizando azeite na fritura da carne.

As amostras classificadas como “bem passadas” foram cozinhadas a um nível considerado comestível.

2.2.2 – Bifes marinados (cerveja e vinho) e grelhados ao nível “bem passado”

Determinação das HAAs

Vinte amostras de bife (0,8-1,0 cm de espessura) foram usadas na determinação das AHs, estas cortadas manualmente em peças com dimensões semelhantes de cerca de 90-100 g cada. Os bifes foram sujeitos a duas marinadas de composição diferente, nomeadamente cerveja e vinho, e também diferentes tempos de exposição, 1, 2, 4 e 6 horas. As amostras controlo não foram sujeitas a nenhuma marinada. Após as respectivas marinadas os bifes foram grelhados num grelhador metálico, em que se utilizou um bico de fogão a gás como fonte de calor. A temperatura na superfície do metal foi monitorizada com um termómetro e mantida entre os 160 e 180 °C. O tempo

de confecção culinária foi de 8 minutos (4 minutos de cada lado). A perda de peso nas amostras controlo foi de 45% e nas amostras marinadas variou entre 49 e 53%.

Os bifes foram cortados e triturados com o auxílio de uma picadora e armazenados a uma temperatura de -20 °C, para posterior análise.

Condições similares foram adoptadas para a carne sem marinada (amostras controlo).

Avaliação do perfil descritivo sensorial

No teste de análise sensorial, foram usados 260 bifes (amostras), dos quais 108 para treino, e os restantes para as sessões de avaliação. As amostras foram marinadas em dois contentores de plástico, um com cerveja e outro com vinho tinto, de forma a ficarem completamente cobertas pela respectiva marinada, e foram deixadas à temperatura ambiente. As amostras controlo não foram marinadas. Após as respectivas marinadas, os bifes foram grelhados num grelhador metálico, utilizando um bico de fogão a gás como fonte de calor. A temperatura na superfície do metal foi monitorizada com um termómetro, e mantida entre os 160 e os 180°C. O tempo de confecção culinária foi de 8 minutos (4 minutos de cada lado do bife).

2.3 - EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO

2.3.1 – Extracção e purificação por SPE com obtenção de duas fracções – Método modificado de Gross.

A extracção e purificação foram efectuadas de acordo como o método desenvolvido por Gross (1990) e modificado por Galceran et al (1996b), sendo este procedimento considerado método de referência em exercícios interlaboratoriais (Santos *et al.* 2004).

Na preparação da amostra 5 gramas de amostra de bife foram homogeneizados em 20 mL de NaOH 1M com o auxílio de banho de ultrassons (10 minutos), a suspensão foi mantida sob agitação durante 1 hora, usando para tal um aparelho agitador de vortex. Após a agitação, a solução alcalina foi misturada com o material de enchimento Extrelut[®] (16 gramas) e colocada a mistura na coluna Extrelut[®]. Um cartucho de PRS, depois de pré-acondicionado com 7 mL de DCM, foi acoplado com a coluna de Extrelut[®]. Para extrair as HAAs da terra de diatomáceas foram passados 75 mL de DCM através da montagem.

As HAAs foram extraídas e purificadas constituindo duas fracções. Na primeira fracção foram extraídas as aminas apolares e na segunda as polares. Para a extracção da primeira fracção foram passados através dos cartuchos de PRS, as soluções de lavagem, que consistiam em 6mL de HCl 0,01M, seguido de 15 mL de MeOH/HCl 0,1M (60:40 v/v) e 2 mL de água. Esta solução contendo os compostos apolares (A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2, PhIP), purificados após a adição de 25 mL de água, foi por fim neutralizada com 500 μ l de amónia. A solução neutralizada foi passada através de um cartucho C18 (500 mg), previamente acondicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água, concentrando assim as HAAs apolares. Finalmente, os cartuchos C18 foram lavados com 5 mL de água e as HAS adsorvidas foram eluidas com 1,4 mL de metanol/amónia (90:10 v/v) (Figura 2.1).

As aminas polares (Glu-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx), constituintes da segunda fracção, foram extraídas com um cartucho Bond Elut C18 (100 mg), previamente acondicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água, que foi acoplado ao cartucho PRS já anteriormente mencionado. Depois disto, as HAAs polares foram eluidas da coluna, de forte troca catiónica, com 20 mL de acetato de

amónia 0,5M a pH 8,5. Por fim, o cartucho C18 contendo as HAAs polares foi lavado com 5 mL de água e as HAAs adsorvidas foram eluídas com 0,8 mL de metanol/amónia (9:1, v/v) (Figura 2.1). Os dois extractos contendo os compostos polares e apolares foram evaporados, cuidadosamente, sob corrente de azoto, as HAAs foram reconstituídas em 80 µL de metanol/fase móvel (1:1). Os extractos obtidos foram analisados utilizando um método de HPLC-DAD-FLD descrito na próxima secção.

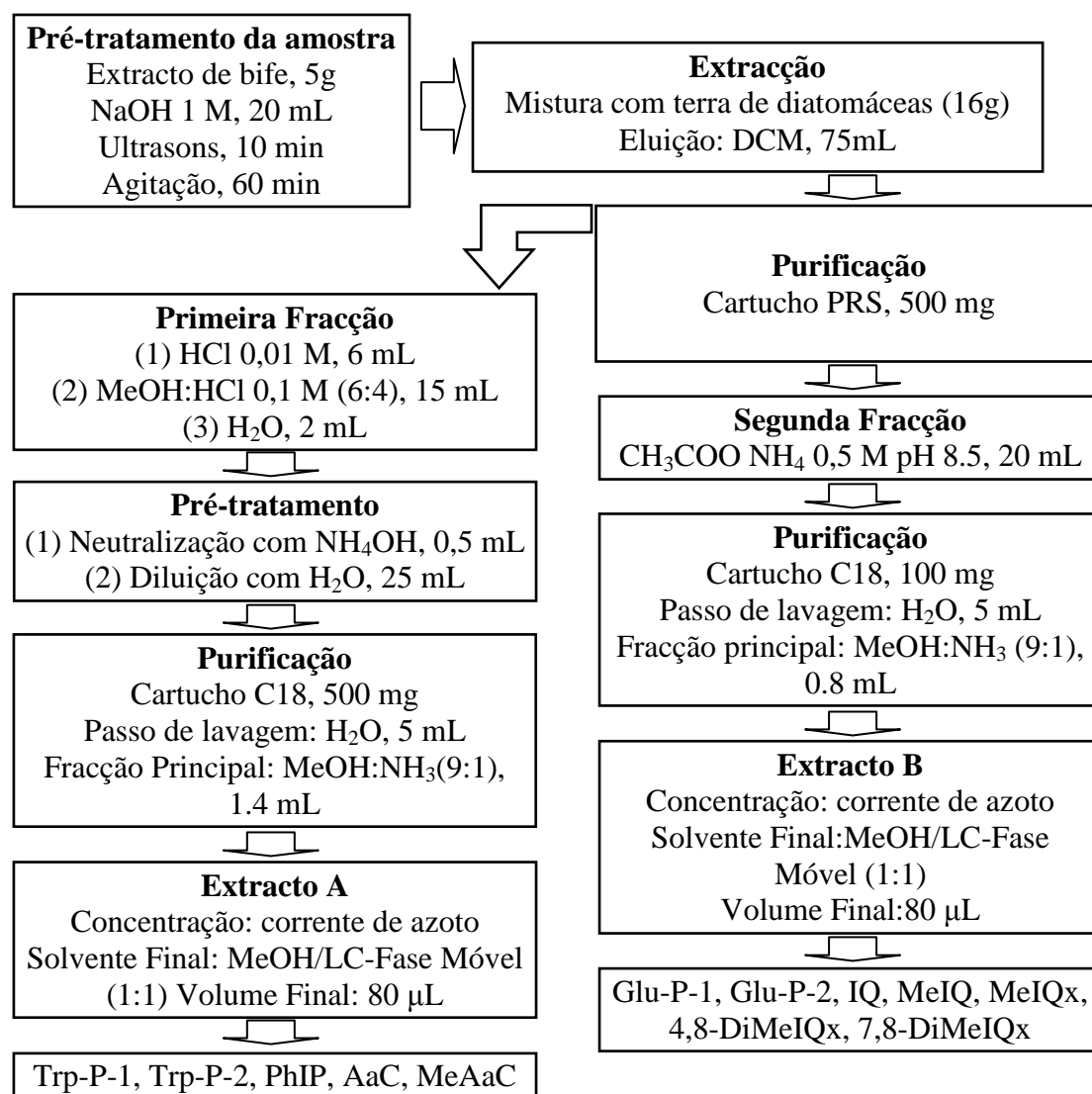


Figura 2.1: Esquema do processo de extracção e purificação das HAAs por SPE com obtenção de duas fracções.

2.3.2 – Extracção e purificação por SPE com obtenção de um único extracto – Método de Toribio

A extracção e purificação foram realizadas de acordo como o método desenvolvido por Toribio *et al.* (2007).

Na preparação da amostra, 5 gramas de amostra de carne foram homogeneizados em 20 mL de NaOH 1M com ultra-sons (10 min), a suspensão foi mantida sob agitação durante 1 hora, usando para tal um aparelho agitador de vortex. A solução alcalina foi misturada com o material de enchimento Extrelut[®] (16g) e esta mistura foi colocada na coluna Extrelut[®]. Uma coluna Bond Elut PRS, depois de pré-condicionada com 7 mL de DCM, foi acoplada com a coluna de Extrelut[®]. Para extrair as HAAs da terra de diatomáceas foram passados 75 mL de DCM através da montagem. Foram passadas através das colunas de PRS as soluções de lavagem, que consistiam em 15 ml de metanol:água (40:60) e 2 mL de água. As HAAs foram eluídas para uma coluna Bond Elut C18 com 20 mL de de acetato de amónia 0,5 M a pH 8,5 e finalmente transferidas para um microtubo de centrífuga, com 0,8 mL de metanol:amónia (90:10) (Figura 2.2). Esta solução foi levada à secura em corrente de azoto. As HAAs foram reconstituídas em 80 µL de metanol/fase móvel (1:1). O extracto obtido foi analisado utilizando um método de HPLC-DAD descrito na próxima secção.

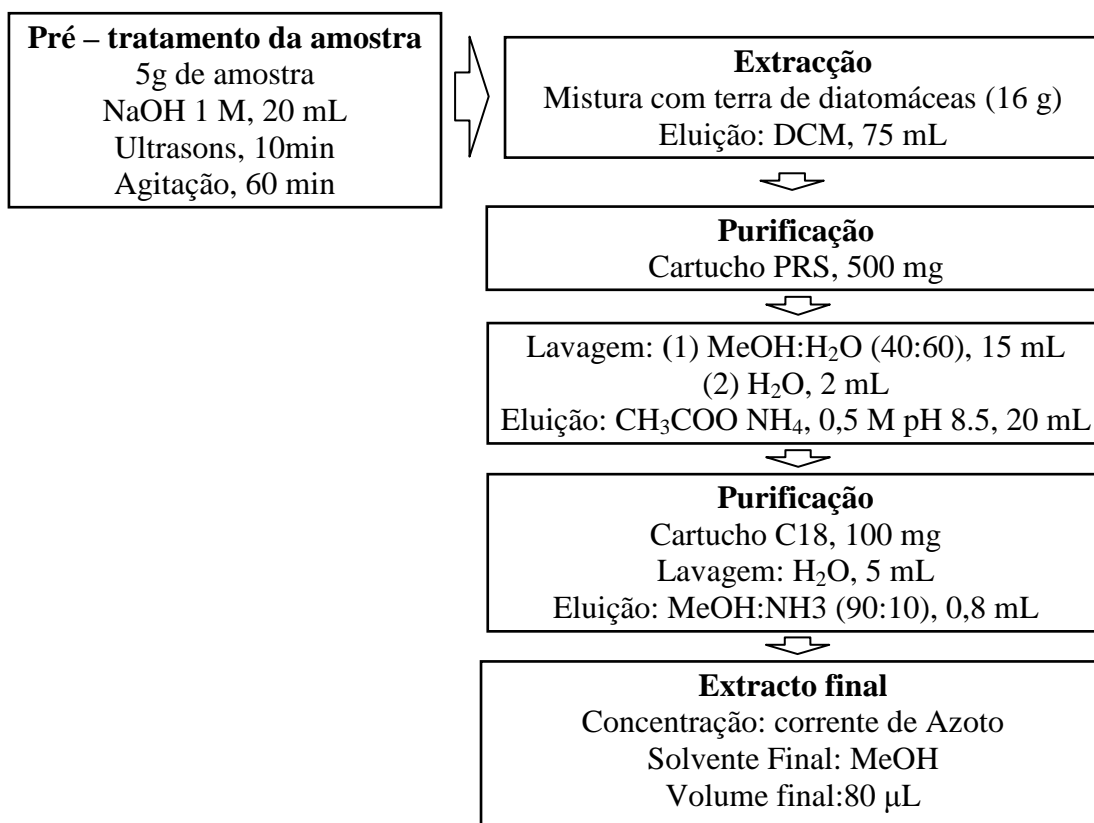


Figura 2.2: Esquema do processo de extracção e purificação das HAAs por SPE com obtenção de uma única fracção.

2.3.3 – Extracção e purificação por Micro Extracção em Fase Sólida (SPME)

A extracção e purificação foram efectuadas de acordo como o método desenvolvido por Martín-Colero *et al.* (2007).

Na preparação da amostra, foram adicionados 3 mL de solução de extracção (2.5% metanol e 0.05M NaOH) a 1 grama de amostra de carne e, posteriormente, efectuou-se a respectiva fortificação da mesma. De seguida, foi levada a um banho de ultrasons durante 4,5 min a 45 °C. A suspensão foi sujeita a uma centrifugação, durante 20 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi separado e colocado em outro tubo de plástico de 15 mL. O resíduo sólido foi sujeito a uma segunda extracção com 3 mL de solução de extracção, sendo então realizada uma segunda centrifugação durante 1 hora a 12000 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionado ao sobrenadante da primeira extracção. Posteriormente uma porção de 4 mL de solução sobrenadante foi colocada num frasco de vidro de 4 mL. Este frasco foi selado com uma rolha de septo e a fibra directamente imersa na solução durante 30 minutos à temperatura ambiente. A solução foi agitada (800 ciclos por minuto) com o auxílio de um pequeno agitador magnético, de forma a aumentar a taxa de equilíbrio (esquema apresentado na Figura 2.3).

Após a extracção, a fibra foi recolhida na agulha, e a agulha removida do septo e inserida na câmara de desadsorção da interface SPME-HPLC que se encontra desconectada quando a válvula está colocada na posição de carga. A câmara (60 µL) foi previamente enchida com metanol, assim, ficando a fibra embebida durante 9 minutos (*soaking time*). De seguida, a válvula é movida para a posição de injeção e os compostos são encaminhados para a coluna. A válvula volta novamente para a posição de carga, após 1 minuto (tempo de desadsorção). Por fim, a fibra é lavada com uma mistura da fase móvel (B:C, 50:50), para minimizar a possibilidade de “*carryover*” dos compostos, então a fibra é removida e a câmara lavada com metanol.

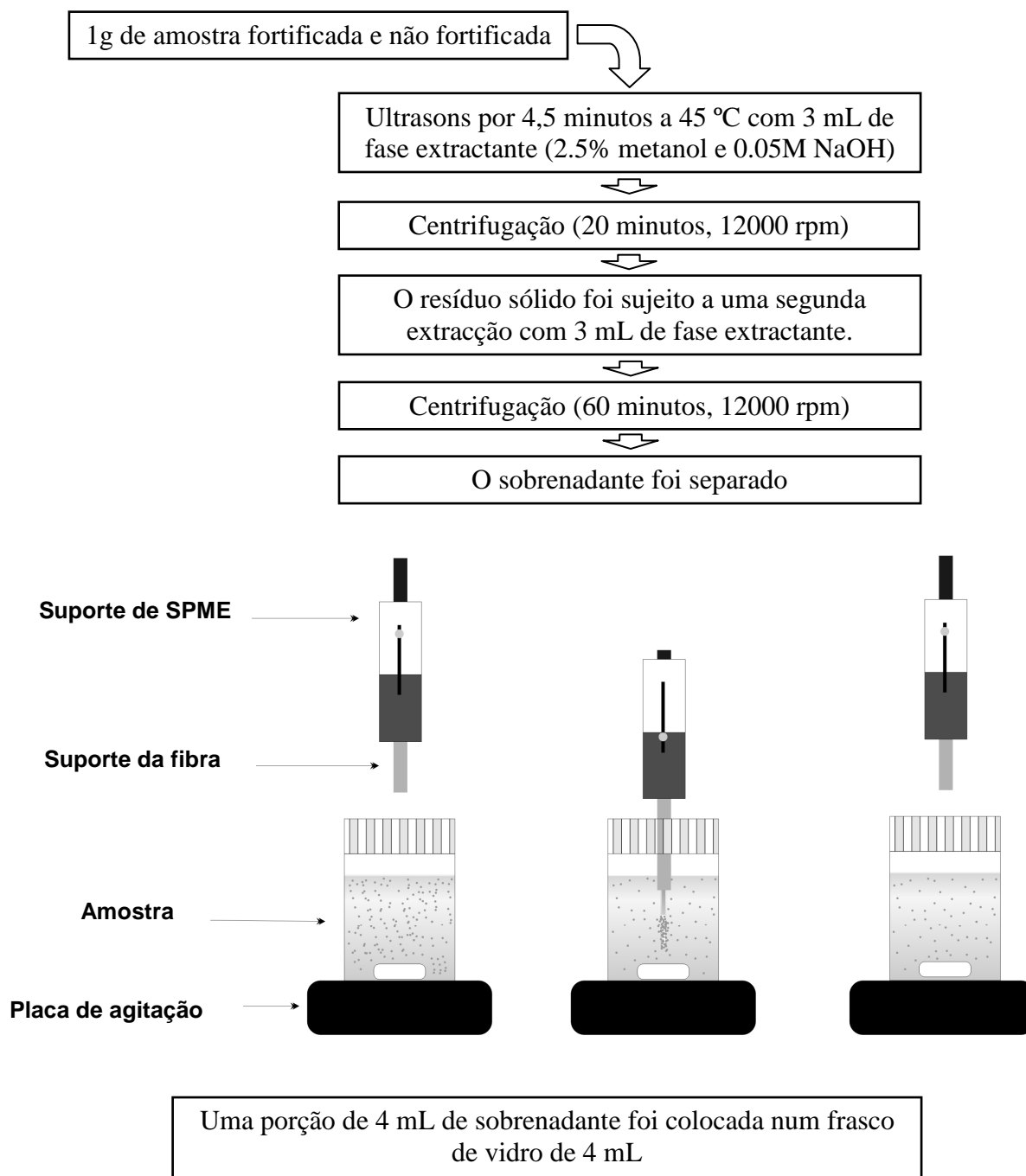


Figura 2.3: Esquema do processo de extracção e purificação das HAs por SPME.

2.4 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO

2.4.1 – Equipamento

As análises cromatográficas foram efectuadas em equipamento de HPLC (Jasco, Japão), composto uma bomba Jasco PU – 1580, um injector automático AS-950, um detector de díodos MD 910, um detector de fluorescência MD-920 e uma coluna TSK gel ODS80 (Toyo Soda) (5 μ m; 250 mm de comprimento; 4.6 mm de diâmetro interno). Também foi utilizado o Borwin PDA Controller Software (JMBS Developments, Le Fontanil, France) para aquisição dos dados cromatográficos.

A fase móvel foi constituída por: solvente A, trietilamina 0,01M ajustado com ácido *orto*-fosfórico a um pH 3,2, solvente B com constituição igual ao solvente A, mas ajustado a pH 3,6 e solvente C foi acetonitrilo. O programa para a separação cromatográfica das HAs foi o gradiente linear apresentado na Tabela 2.1:

Tabela 2.1: Gradiente linear de separação cromatográfica das HAs.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente C (%)
0	95	0	5
10	85	0	15
10,1	0	85	15
20	0	75	25
30	0	45	55
30,1	45	0	55
55	95	0	5
60	95	0	5

As separações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente. Procedeu-se à criação de uma biblioteca de espectros UV das diferentes HAAs, sendo a identificação dos picos obtida por comparação do tempo de retenção e correlação dos espectros UV das amostras com a biblioteca de espectros UV das HAAs. Adicionalmente, também foi utilizada uma detecção por fluorescência aplicando comprimentos de onda de 307 nm para excitação e 370nm para emissão.

2.4.2 – Quantificação das HAAs

Como referido em 2.1.8 a eficiência analítica da extracção das HAAs é sempre menor que 100%, as quantidades detectados têm que ser corrigidas devido às baixas recuperações conseguidas, pois o complexo método extractivo ocasiona elevadas perdas. Numa fase inicial do trabalho os teores de HAAs foram obtidos após correcções de acordo com as percentagens de recuperação de cada uma. Posteriormente optou-se por utilizar o método das adições de padrão, que consiste na adição de quantidades conhecidas dos compostos a analisar a quantidades conhecidas de amostra. As áreas dos picos cromatográficos obtidos são representadas em função das concentrações de HAAs adicionadas às amostras, construindo-se uma curva de calibração. O ponto onde a curva corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico na amostra sem adição de padrão. A extrapolação das leituras fornece o valor da concentração das HAAs nas amostras. Deste modo, efectuou-se a adição de 25 e 50 ng da solução metanólica dos padrões IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e Trp-P-1 e de 50 e 100 ng dos padrões Glu-P-1, Trp-P-2, PhIP, AαC e MeAαC, antes da realização da extracção.

2.5 – TESTES SENSORIAIS

A análise sensorial descritiva foi efectuada por dois painéis treinados (27 membros) para avaliar a intensidades das características sensoriais das amostras de carne grelhadas e a influência das marinadas. Após grelhar as amostras foram servidas quentes aos dois painéis sensoriais. A análise incluiu a avaliação da cor, do odor, do aroma e do *flavor* dos bifes. Também se avaliou a suculência e a tenrura. A avaliação sensorial foi realizada numa escala de 1 a 7, onde 1 representava a menor intensidade e 7 a maior intensidade, para todos os atributos.

O painel de análise sensorial foi treinado usando amostras de carne marinada e não marinada. O treino decorreu em quatro sessões de 1 hora de forma a obter repetibilidade nos resultados. Na primeira sessão, os provadores testaram amostras de carne controlo e foram convidados a os termos os termos que descreviam as suas observações pessoais. Na sessão 2, os termos redundantes foram eliminados e as amostras que apresentavam atributos diferentes foram testadas para incluir novos atributos. Na sessão 3 todos os atributos seleccionados foram usados numa escala não

estruturada de 1 a 7 pontos. Amostras com diferentes intensidades de cada atributo foram testadas em conjunto pelo painel. Na sessão 4 os diferentes atributos foram avaliados individualmente pelos provadores em amostras desconhecidas. Os dados foram reunidos e analisados por análise de variância (ANOVA), os desvios de cada provador, em relação ao valor médio obtido para cada atributo, foram usados para avaliar se uma sessão de treino adicional era necessária.

Nas sessões de avaliação, as amostras de bife, incluindo, amostras controlo e marinadas, foram codificadas com 3 dígitos. Em cada sessão, os provadores receberam um máximo de 5 amostras para avaliar. As amostras foram servidas de forma aleatória e foram realizadas duas sessões para cada painel.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS HAAs POR HPLC/DAD

3.1.1 - Validação do método de HPLC/Díodos

O HPLC é a metodologia mais utilizada na análise de HAAs. Neste trabalho a metodologia de HPLC foi utilizada inicialmente apenas com detecção por Díodos, mas depois, associada também a detecção por fluorescência para baixar os limites de detecção de algumas HAAs. Estas apresentam um espectro de UV característico e elevados coeficientes de extinção. As HAAs apolares e a PhIP apresentam fluorescência em solventes polares, enquanto que a IQ, a MeIQ e a MeIQx não são fluorescentes.

Avaliou-se a linearidade para cada HAAs, utilizando o detector de díodos, nos intervalos de concentração indicados na Tabela 3.1, para um λ de 263 nm. As curvas de calibração foram calculadas a partir da área de pico cromatográfico *versus* a concentração de cada composto. As curvas foram ajustadas a uma função linear, obtendo-se coeficientes de regressão superiores a 0,9955. Os limites de detecção, baseados num sinal:ruído de 3:1 foram avaliados com soluções padrão, os valores obtidos apresentam-se, igualmente, na Tabela 3.1.

Efectuou-se a avaliação da repetibilidade (precisão no mesmo dia) e da reprodutibilidade (precisão ao longo de vários dias) do método de HPLC/DAD. Para calcular a repetibilidade, foram efectuadas, no mesmo dia, seis injeções consecutivas de uma mistura de padrões contendo todas as HAAs com uma concentração de 1000 ng/mL. A Figura 3.1 apresenta um cromatograma típico obtido através da injeção de uma solução padrão de 1000 ng/mL. Na avaliação da reprodutibilidade foi utilizada a mesma mistura padrão, injectada dez vezes em dias diferentes.

Tabela 3.1: Parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção, avaliados pelo método do padrão externo, para λ de 263 nm.

	Intervalo de Concentração (ng/mL)	Declive (área units/ng)	r	Limite de detecção (ng)
Glu-P-2	200 – 2500	3.4×10^4	0.9983	0.4
IQ	100 – 1000	1.7×10^5	0.9963	0.2
IQx	100 – 1000	1.1×10^5	0.9993	0.2
MeIQx	30 – 1000	3.2×10^5	0.9993	0.06
Glu-P-1	200 – 2500	5.9×10^4	0.9987	0.4
MeIQ	100 – 1000	1.1×10^5	0.9955	0.2
7,8-DiMeIQx	30 – 1000	3.0×10^5	0.9985	0.06
4,8-DiMeIQx	30 – 1000	3.0×10^5	0.9988	0.06
TriMeIQ	100 – 1000	1.1×10^5	0.9955	0.2
Trp-P-2	100 – 1000	1.7×10^5	0.9991	0.2
PhIP	200 – 2500	3.5×10^4	0.9976	0.4
Trp-P-1	30 – 1000	3.0×10^5	0.9976	0.06
AaC	100 – 1000	9.7×10^4	0.9992	0.2
MeAaC	200 – 2500	4.2×10^4	0.9962	0.4

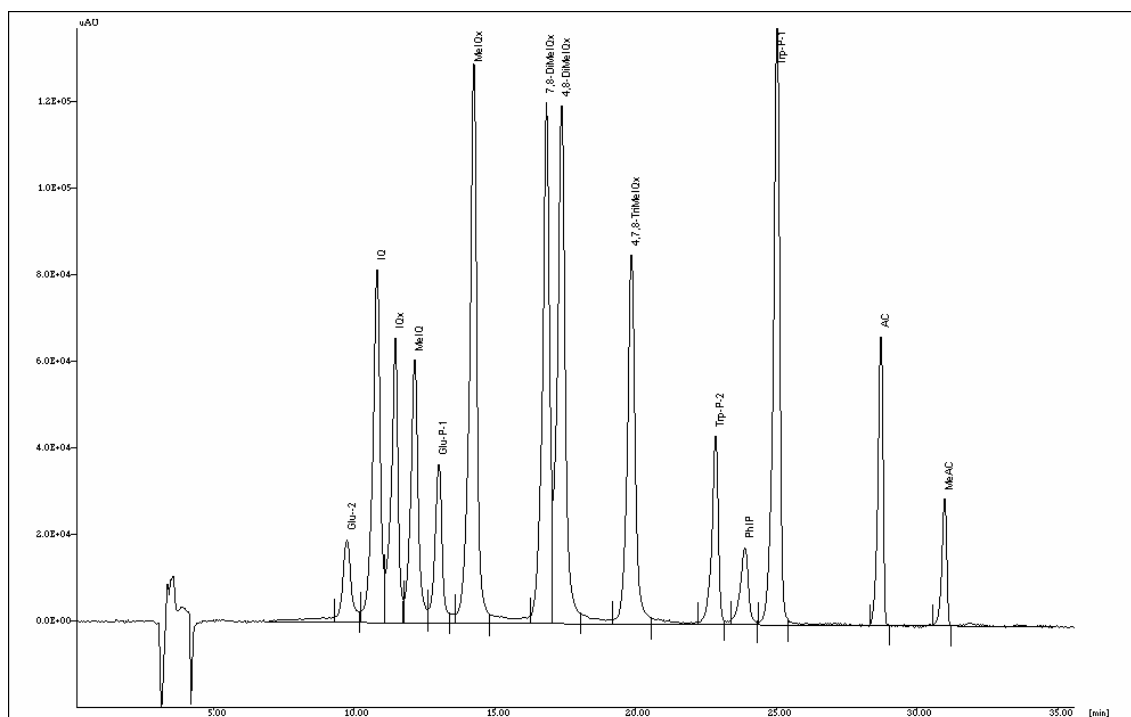


Figura 3.1: Cromatograma típico de uma mistura de 14 padrões de HAs, com concentração de 1000 ng/mL, detecção por díodos ($\lambda = 263$ nm).

Na Tabela 3.2 encontram-se os valores de RSD obtidos para a repetibilidade e reprodutibilidade do tempo de retenção e da concentração, avaliadas com soluções padrão, que nos indicam a precisão (RSD) dos resultados.

No que respeita à precisão do tempo de retenção (R_t , min), obtiveram-se valores de repetibilidade que variaram entre 0,12 e 1,84% e valores de reprodutibilidade que variaram entre 0,33 e 2,75%. Por outro lado, na precisão da concentração, obtiveram-se valores de repetibilidade que variaram entre 2,54 e 10,03% e valores de reprodutibilidade que variaram entre 3,12 e 17,61%.

Os resultados obtidos são concordantes com os publicados por outros autores (Toribio et al 2002; Cardenes et al 2006).

Tabela 3.2: Repetibilidade e reprodutibilidade do método de HPLC avaliada com soluções padrão.

HAAs	Precisão RSD %			
	Rt (tempo de retenção, min)		Concentração (1 ng/ μ l)	
	repetibilidade (n=6, $\alpha=0.05$)	reprodutibilidade (n=10, $\alpha=0.05$)	repetibilidade (n=6, $\alpha=0.05$)	reprodutibilidade (n=10, $\alpha=0.05$)
Glup-P-2	1.84	1.66	2.54	4.78
IQ	0.69	2.54	2.98	3.18
IQx	0.91	1.40	3.02	3.78
MeIQ	0.48	2.75	2.87	3.12
Glup-P-1	1.11	1.99	3.12	4.66
MeIQx	0.84	1.48	5.88	9.22
7,8DiMeIQx	0.34	0.34	9.14	15.44
4,8DiMeIQx	0.74	1.16	9.54	16.45
4,7,8-TriMeIQx	0.39	0.58	9.36	12.65
Trp-P-2	0.59	1.22	10.03	17.69
PhIP	0.39	0.60	9.98	14.15
Trp-P-1	1.57	1.28	6.11	8.21
AαC	0.12	0.76	8.59	16.17
MeAαC	0.18	0.33	4.66	9.70

3.1.2 - Extração das HAAs: Comparação de dois métodos de SPE

Como foi referido anteriormente (secção 2.1.7) os teores baixos de HAAs encontrados nas matrizes alimentares (frequentemente entre 0,1-50 ng/g), a complexidade destas matrizes e a necessidade de executar várias etapas de isolamento para eliminar interferentes, tornam a extração das HAAs um processo difícil e moroso.

Neste trabalho foram comparados dois métodos diferentes de extração em fase sólida (SPE) para isolar as HAAs em estudo: (i) o método de Gross modificado (Santos *et al.* 2004), que associa extração líquido – líquido (LLE) com terra de diatomáceas como suporte sólido e duas etapas com ácido propilsulfónico (PRS) e C18, levando à obtenção de dois extractos: um para a determinação das HAAs apolares (AαC, MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2) e outro para a determinação das HAAs polares (Glu-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP) e (ii) o método de Toribio *et al.* (2007), que é mais rápido, levando à obtenção de um único extracto com as amins polares e apolares.

A avaliação dos dois métodos de SPE foi feita pelo estudo comparativo das percentagens de recuperação. A avaliação da recuperação das HAAs nos extractos de carne foi efectuada pela adição de quantidades conhecidas de padrões. Antes do tratamento da amostra, o extracto de carne foi fortificado com 25 ou 50 ng das diferentes HAAs em solução metanólica. De seguida, foi aplicado o procedimento de extração às amostras não fortificadas e fortificadas. A recuperação foi calculada recorrendo a uma curva de calibração externa.

No método de Gross modificado, foram obtidas percentagens de recuperação mais elevadas 27 a 50,6% para os compostos do tipo IQx, 60% para o PhIP, 31,6% para o Glu-P-1 e 41,2% a 60,3% para as HAAs pirolíticas (Tabela 12).

No método de Toribio *et al.* (2007), a extração dos compostos é de execução mais rápida e menos dispendiosa, uma vez que utiliza menos reagentes e colunas de SPE. Neste método, contrariamente ao anterior, as HAAs obtêm-se no mesmo perfil cromatográfico. Foram obtidas percentagens de recuperação de 27,2% a 32,5% para os compostos do tipo IQx, 43,1% para o PhIP, 25,4% para o Glu-P-1 e 25,4% para as HAAs pirolíticas (Tabela 12).

Aplicando o teste *t*-Student, verificou-se não existirem diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos para os compostos IQ, Glu-P-1 e MeIQx.

As restantes HAAs apresentaram percentagens de recuperação significativamente mais elevadas ($p < 0,05$) na extracção pelo método de Gross modificado, especialmente as do tipo pirolítico

Tabela 3.3: Recuperação (%) das HAAs em amostras de carne fortificadas usando o método de Gross modificado (Santos et al 2004) e o método de Toribio et al (2007).

HAAs	Método de Gross modificado (% recuperação \pm SD)	Método de Toribio (% recuperação \pm SD)
IQ	30,6 \pm 5,1	32,1 \pm 4,7
Glu-P-1	31,6 \pm 4,7	25,4 \pm 4,3
MeIQx	27,2 \pm 7,5	27,2 \pm 7,2
4,8-DiMeIQx	50,6 \pm 4,0	32,5 \pm 4,0
Trp-P-2	54,1 \pm 6,5	40,7 \pm 5,9
PhIP	60,0 \pm 5,0	43,1 \pm 4,9
Trp-P-1	41,2 \pm 3,6	20,9 \pm 3,3
AαC	60,3 \pm 5,0	25,4 \pm 4,8
MeAαC	55,0 \pm 5,0	24,6 \pm 4,7

O método de Gross modificado, embora mais dispendioso e moroso, foi seleccionado para a análise de amostras de carne, pois permite a obtenção de percentagens de recuperação mais elevadas. No entanto, devido à complexidade da matriz verifica-se o aparecimento de substâncias interferentes nos extractos finais, principalmente, na fracção que contém as HAAs apolares (Figura 3.2).

Os valores de percentagens de recuperação obtidos são comparáveis aos encontrados na literatura (Galceran *et al.* 1996; Santos *et al.* 2004). A presença de macromoléculas nas amostras de carne processada, tais como os lípidos e proteínas, originam uma baixa eficiência de extracção das HAAs. Isto porque as macromoléculas para além de interagirem com as espécies a analisar, também podem modificar a selectividade dos diferentes passos de extracção e purificação.

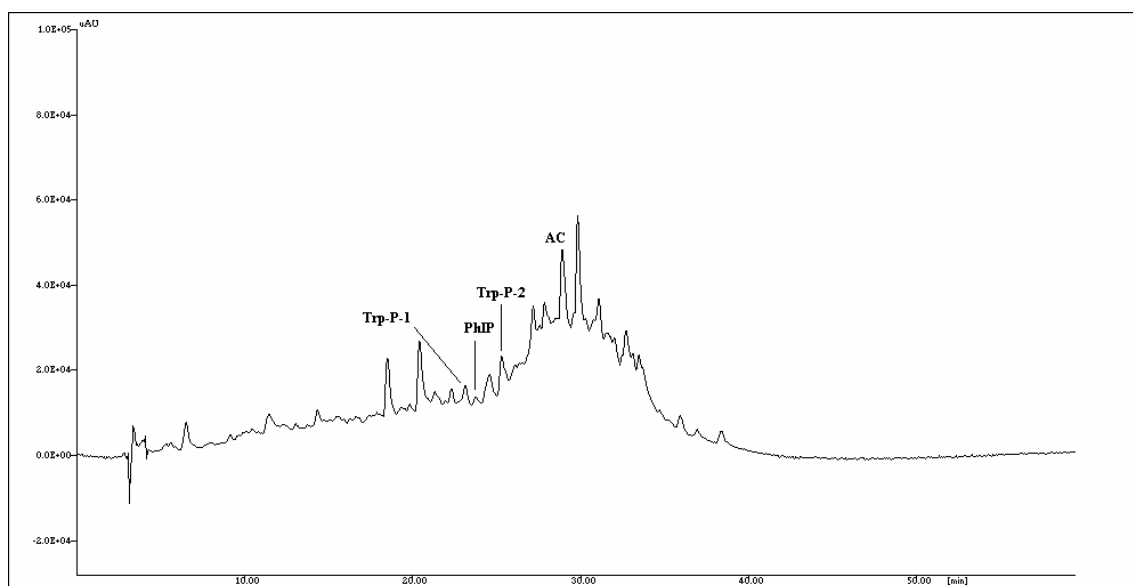


Figura 3.2: Cromatograma típico de HPLC/díodos ($\lambda=263$ nm) obtido na análise da fracção de HAAs apolares (primeira fracção método de Gross modificado) de amostras de carne grelhada.

Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) foram avaliados para as HAAs nas amostras de carne extraídas utilizando o método de Gross modificado, tendo em consideração uma razão sinal:ruído de 3:1 e de 10:1, respectivamente (Tabela 3.4). Esta avaliação foi realizada com adição de teores muito baixos de HAAs, a amostras de carne mal passada, em que estas não tinham sido detectadas. Os limites de detecção foram concordantes com os valores descritos na literatura (Karamanos *et al* 1996; Knize *et al* 2007).

Tabela 3.4: Parâmetros para os limites de detecção e quantificação das HAAs nos padrões e extractos de carne.

HAAs	LODs Amostras de carne (ng/g)	LOQs Amostras de carne (ng/g)
Glu-P-2	1,50	5,00
IQ	0,50	1,70
IQx	0,80	2,60
MeIQx	0,80	2,60
Glu-P-1	1,00	3,30
MeIQ	0,26	0,86
7,8-DiMeIQx	0,17	0,56
4,8-DiMeIQx	0,17	0,56
TriMeIQ	0,50	1,70
Trp-P-2	0,80	2,60
PhIP	1,50	5,00
Trp-P-1	0,30	1,00
AαC	0,80	2,60
MeAαC	0.90	3,00

3.1.3 – Extracção e quantificação de HAAs em pratos de carne tradicionalmente consumidos em portugal.

As amostras de carne foram cozinhadas a dois níveis de cocção: “mal passado” e “bem passado”, com três processos culinários diferentes (frito, grelhado e assado), com e sem adição de ingredientes (sal, alho, vinho, tomate, cebola e azeite na carne assada e, somente, sal, alho e o vinho nas carnes grelhada e frita).

Efectuaram-se as extracções pelo método de Gross modificado e a análise cromatográfica foi realizada por HPLC/DAD ($\lambda=263$ nm). Os resultados, corrigidos de acordo com a percentagem de recuperação de cada HAA e calculados em ng/g de carne cozinhada, apresentam-se na Tabela 3.5, sendo os valores médios de duas determinações. O desvio padrão relativo entre os duplicados foi, geralmente, inferior a 20%.

As HAAs em estudo foram detectadas em maior quantidade nas amostras de bife grelhado, bife frito e carne assada ao nível “bem passado”, enquanto no nível “mal passado” não foram detectadas quaisquer HAAs.

Tabela 3.5: Teores de HAAs em carne cozinhada em condições usuais (ng/g carne cozinhada).

HAAs	Carne grelhada (180-200 °C)		Carne frita (160-180 °C)		Carne assada (250-260 °C)	
	Mal passada ^a	Bem passada ^b	Mal passada ^a	Bem passada ^b	Mal passada ^c	Bem passada ^d
IQ	n.d.	6.05	n.d.	4.86	n.d.	n.d.
Glu-P-1	n.d.	vestígios	n.d.	vestígios	n.d.	n.d.
MeIQx	vestígios	4.51	n.d.	2.57	n.d.	n.d.
4,8-DiMeIQx	n.d.	vestígios	n.d.	vestígios	n.d.	n.d.
TrpP2	n.d.	vestígios	n.d.	n.d.	vestígios	4.33
PhIP	n.d.	vestígios	vestígios	7.85	n.d.	n.d.
TrpP1	n.d.	2.11	n.d.	vestígios	n.d.	2.01
AαC	n.d.	vestígios	n.d.	vestígios	n.d.	vestígios
MeAαC	n.d.	vestígios	n.d.	vestígios	n.q.	2.72

n.d – não detectado

Como se pode verificar na Tabela 3.5 os intervalos de concentração das HAAs obtidos para as diferentes amostras variaram entre n.d – 6,05; n.d – 7,85 e n.d – 2,72 ng/g de amostra cozinhada para os compostos do tipo IQ, para a PhIP e MeAαC, respectivamente. Tal como descrito na literatura, a quantidade de HAAs formadas depende do método culinário e do tempo de cocção. Neste sentido, para o mesmo nível de cocção, podem ser observados perfis semelhantes de HAAs nas amostras de carne frita e nas amostras de carne grelhada. Em ambas as amostras estudadas, não foram detectadas HAAs no nível “mal passado”, no entanto para um nível “bem passado” foram detectadas maioritariamente HAAs do tipo IQ, tendo sido obtido um maior teor destas HAAs nas amostras de carne grelhada. Comparando os valores obtidos de HAAs nas amostras de carne frita, destaca-se a PhIP, que apresenta um valor de 7,85 ng/g. Estes resultados são concordantes comparativamente com os relatados na literatura (Karamanos & Tsegenidis 1996; Knize *et al.* 1997; Busquets *et al.* 2004; Murkovic 2004).

As amostras de carne assada no forno, devido à sua diferente exposição ao calor, à formação de uma crosta e da temperatura do forno, apresentaram um perfil diferente de HAAs, comparativamente com as amostras de carne frita e grelhada. Nestas amostras não foram detectadas aminas do tipo IQ, adicionalmente, apresentam uma maior quantidade de HAAs apolares (MeαC, Trp-P-1 e Trp-P-2), resultantes da pirólise dos aminoácidos sem o contributo de creatinina.

Em diversos estudos foi descrito que a presença de antioxidantes reduz a formação de HAAs na carne cozinhada (Oguri et al 1998). Consequentemente, a adição de ingredientes ricos em antioxidantes é considerada uma medida promissora para reduzir a exposição às HAAs (Murkovic et al 1998; Vitaglione & Fogliano, 2004; Lan et al 2004). A aplicação de especiarias (rosmaninho, tomilho, alho e cebola), azeite e vinho pode reduzir o conteúdo em HAAs. Adicionalmente, o sal confere capacidade de retenção de água, reduzindo o transporte dos precursores até à superfície durante a cocção, o que pode levar à formação de menores teores de HAAs. No entanto, aplicando o test-*t* foi demonstrado que não havia diferenças significativas ($p>0.05$) entre os teores de HAAs obtidos na amostra controlo (carne cozinhada sem ingredientes) e as amostras de carne cozinhadas com os ingredientes usuais da dieta dos portugueses, ricos em antioxidantes. Neste sentido é necessário introduzir alterações nos hábitos culinários para permitir que os ingredientes actuem não só no flavor, mas também como protectores contra a formação de HAAs na culinária tradicional.

3.2. – SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS HAAs POR HPLC/DAD/FLD

Na análise e quantificação das HAAs em bifes grelhados foi acoplado um detector de fluorescência ao sistema de HPLC/DAD descrito anteriormente, uma vez que as HAAs apolares e a PhIP apresentam fluorescência em solventes polares. A sensibilidade do método usando um detector de fluorescência é muito superior em relação à utilização de um detector de Díodos. Os parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção obtidos para as HAAs apolares e para a PhIP apresentam-se na Tabela 3.6. A Figura 3.3 mostra um cromatograma típico obtido através da análise cromatográfica de uma solução padrão de 1000 ng/mL e com detecção por fluorescência (λ =307 nm excitação; λ =370 nm emissão).

Tabela 3.6: Parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção, avaliados pelo método do padrão externo, para λ de 307 nm de excitação e de emissão de 370 nm.

HAAs	Intervalo de Concentração (ng/mL)	Declive (área units/ng)	r	Limite de detecção (ng)
PhIP	1 – 75	7245,1	0,9986	0.02
Trp-P-1	10 – 75	875,94	0,9945	0.06
A α C	1 – 75	13731	0,9987	0.02
MeA α C	1 – 75	7631,8	0,9992	0.02

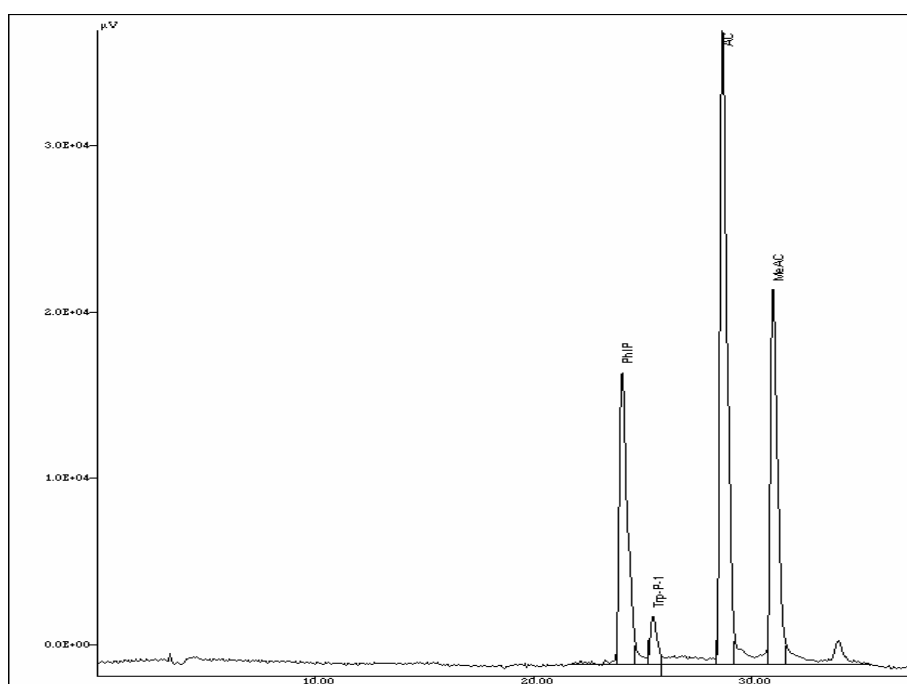


Figura 3.3: Cromatograma típico de uma injeção de uma mistura de padrões de HAAs, com uma concentração de 50 ng/mL e detecção por fluorescência (λ de 307 nm de excitação e de emissão de 370 nm).

3.2.1 – Avaliação da influência da marinada de vinho e de cerveja na composição em HAAs e nas características sensoriais de bife grelhado.

3.2.1.1 *Quantificação das HAAs em carne marinada em cerveja e em vinho tinto*

Grelhar bifes, para as dimensões das amostras anteriormente referidas neste trabalho, durante 4 minutos de cada lado, a uma temperatura situada entre 180 e 200 °C permite obter uma amostra de carne, com um nível de cocção bem passado e boas propriedades organolépticas (Melo *et al* 2008).

A quantificação das HAAs em amostras de bife marinadas e não marinadas foram efectuadas pelo método da adição de padrões, com dois níveis de adição diferentes, anteriormente especificados na secção 2.4.2. A Figura 3.4 ilustra os cromatogramas típicos das duas fracções obtidas pelo método de Gross modificado, bem como as respectivas adições de padrão.

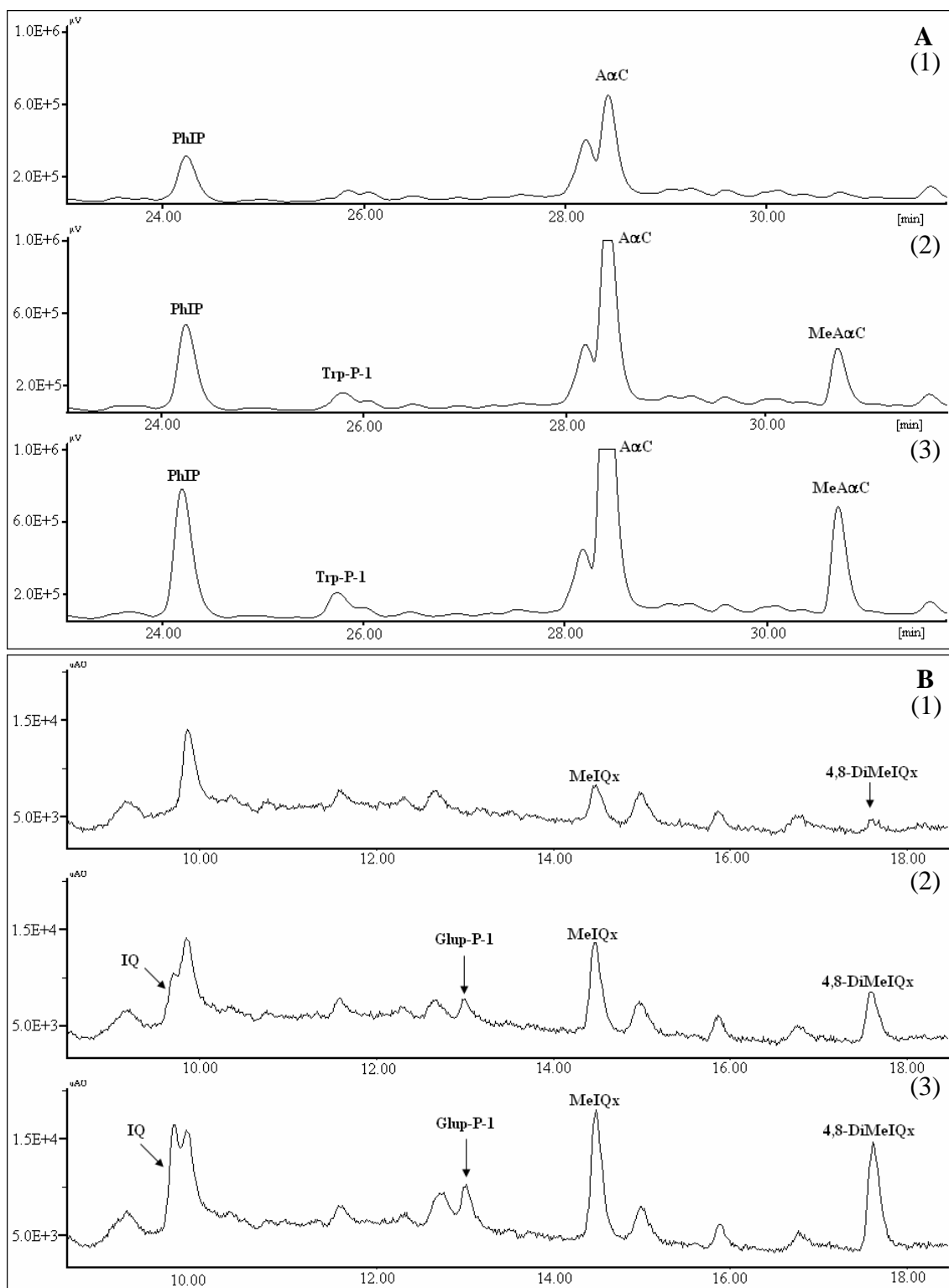


Figura 3.4: Cromatogramas típicos das diferentes HAAs nas amostras de carne grelhada. A – HAAs apolares (primeira fracção) com detecção por FLD (Ex. 307 nm e Em 370 nm). B – HAAs polares (segunda fracção) com detecção por DAD (263 nm). (1) não fortificado, (2) fortificado com 5 ng/g para IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e Trp-P-1; com 10 ng/g para Glup-P1, Trp-P-2, PhIP, AαC e MeAαC; (3) fortificado com 10 ng/g para IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx e Trp-P-1; e com 20 ng/g para Glup-P1, Trp-P-2, PhIP, AαC e MeAαC.

Nas amostras de carne não marinada foram quantificadas quatro HAAs, nomeadamente, a MeIQx, a 4,8-DiMeIQx, a PhIP e a A α C, com as seguintes concentrações: 3.6 ± 0.5 , 1.3 ± 0.7 , 33.8 ± 5.5 e 19 ± 2.5 ng/g, respectivamente. As HAAs Trp-P-1, Trp-P-2 e MeA α C foram identificadas, abaixo do limite de quantificação, as restantes 7 HAAs não foram identificadas nas amostras de carne não marinadas. Os resultados obtidos estão em conformidade com estudos previamente publicados (Jautz *et al* 2008). O trabalho de revisão de Murkovic 2007, refere teores de PhIP na carne vermelha próximos de 35 ng/g, a A α C varia entre 0-20 ng/g, a MeIQx varia entre 0-10 ng/g e a 4,8-DiMeIQx oscila entre 0-5 ng/g. Teores mais baixos estão descritos para Trp-P-1 e Trp-P-2, entre 0-1 ng/g.

As amostras não marinadas foram usadas como controlo, uma vez que este tipo de amostra é geralmente utilizado pelos consumidores. Adicionalmente, Busquets *et al* (2006) estudaram o efeito físico provocado pela mistura etanol/água, com uma composição alcoólica semelhante ao vinho, e analisaram as amostras após a cocção. Os resultados obtidos não evidenciaram uma redução na quantidade de HAAs após a marinada em etanol/água.

As amostras de bife foram marinadas em cerveja Pilsner e vinho tinto da região do Douro para estudar os seus efeitos na redução da quantidade de HAAs. A cerveja e o vinho tinto são uma fonte rica de polifenóis, provenientes do malte e uvas, respectivamente. O conteúdo total de polifenóis e a actividade antioxidante, do vinho e da cerveja, têm sido extensamente estudados nos últimos anos. O vinho tinto possui quantidade superior de polifenóis e maior actividade antioxidante, quando comparado com a cerveja (Pulido *et al* 2003).

A marinada de cerveja ou de vinho afecta a formação das HAAs, tal como se pode observar na Figura 3.5, em que se apresenta a concentração (ng/g de bife) das diferentes HAAs nos bifes grelhados, marinados e não marinados. As barras de erro indicam o desvio padrão obtido na quantificação das HAAs. As mesmas quatro HAAs foram quantificadas nas amostras marinadas e não marinadas. Verificou-se que a marinada com cerveja ou vinho resultou numa redução da quantidade das HAAs, excepto, para o 4,8-DiMeIQx após uma e duas horas de marinada com vinho.

As marinadas em cerveja e em vinho reduzem significativamente a quantidade de PhIP ($p<0,05$), no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de PhIP da carne marinada com cerveja e com vinho (Tukey test).

Adicionalmente, a redução dos níveis de PhIP na carne marinada com o aumento do tempo de marinada não foi significativa ($p=0.204$) (Figura 3.5)

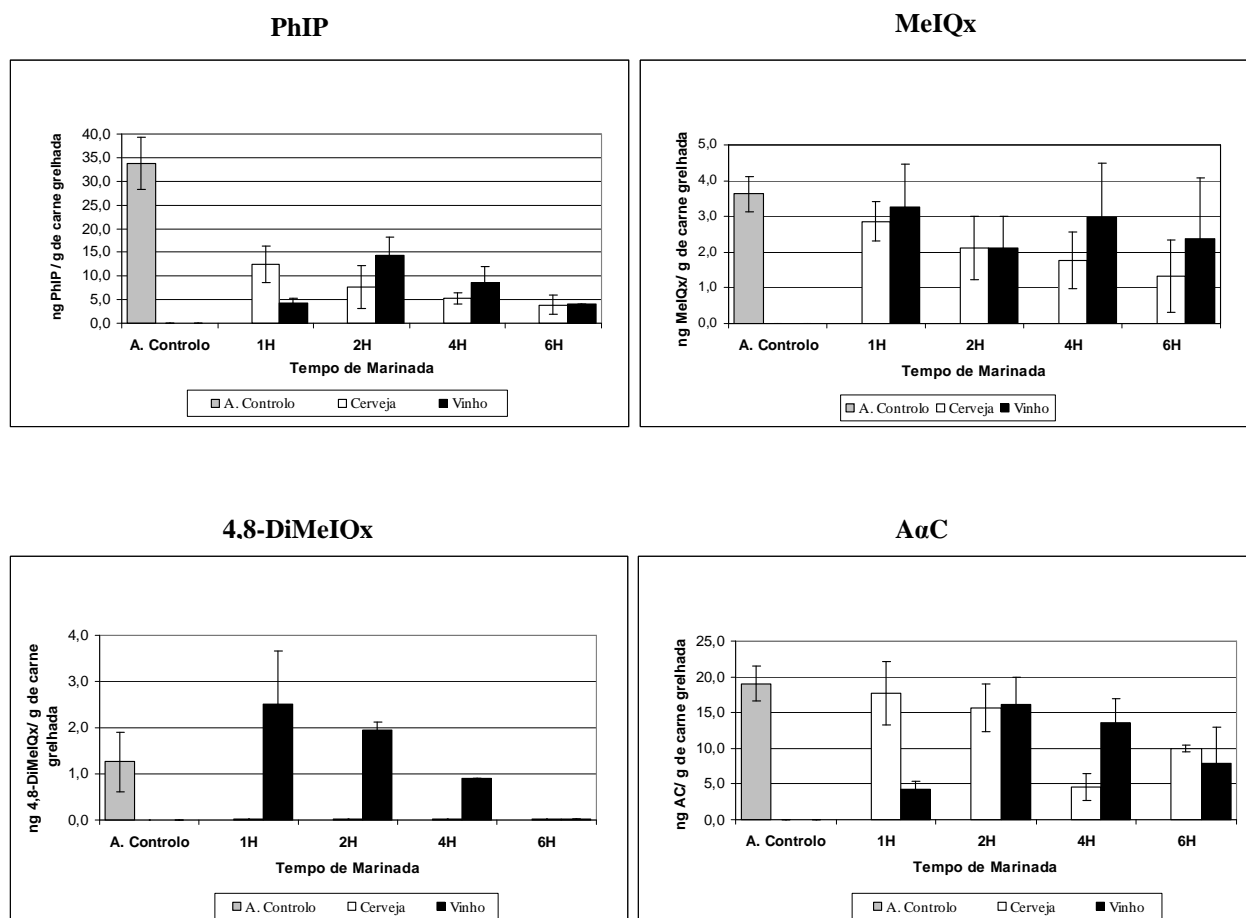


Figura 3.5: Efeitos do tempo e meio de marinada na concentração das HAAs.

O efeito redutor (88% após 6 horas) da marinada em vinho ou em cerveja na formação da PhIP é muito importante, pois esta HAA é a mais abundante na carne grelhada. Uma redução pronunciada da PhIP (83 – 88 %) também foi obtida por Busquets et al (2006), usando três tipos diferentes de vinho tinto para marinar frango frito, este apresentou uma grande quantidade de PhIP.

Na literatura estão descritos estudos sobre o potencial antigenotóxico dos componentes da cerveja contra carcinogénios encontrados na dieta humana, nomeadamente a PhIP (Arimoto-Kobayashi et al 2006; Nozawa et al 2006). Nesses trabalhos, recorrendo ao teste de Ames verificaram que amostras de cerveja inibem a mutagenicidade das HAAs. As soluções de cerveja que foram administradas oralmente em ratos, reduzem significativamente a formação de aductos do PhIP com o DNA, no

cólon e pulmões do rato, comparando com os ratos controlo alimentados com PhIP na ausência da solução de cerveja na dieta. Os resultados deste estudo mostraram que os componentes da cerveja actuavam com uma capacidade protectora contra os efeitos genotóxicos das HAAs *in vivo*. Contudo, não foram encontrados trabalhos sobre o efeito da marinada de cerveja na redução da formação da PhIP.

As marinadas de cerveja e vinho reduzem significativamente a quantidade de MeIQx ($p < 0.05$), sendo que, uma maior redução foi observada nas marinadas de cerveja (em média 44%) em comparação com as marinadas de vinho (em média 33%). No entanto, as diferenças entre cerveja e vinho não foram estatisticamente significativas (test Tukey). A redução dos níveis de MeIQx em amostras de carne marinada com o aumento do tempo de marinada não foi significativa ($p = 0.113$).

O efeito das marinadas de vinho e de cerveja na redução da formação da MeIQx não foi tão notório como o observado para a PhIP. Contudo, deve ser realçado que o efeito dos antioxidantes na formação da MeIQx continua a ser controverso (Oguri *et al* 1998). De acordo com a literatura, estudos realizados sobre os efeitos inibidores dos antioxidantes na formação das HAAs, revelaram que alguns antioxidantes suprimiam a formação da MeIQx, enquanto que, outros poderiam promover a sua formação (Oguri *et al* 1998). Um aumento da quantidade da MeIQx em carne grelhada marinada foi observado por Busquets *et al* (2006) e por Salmon *et al* (1997) usando diferentes tipos de marinada.

Na literatura não foram encontrados trabalhos no que respeita a marinadas em cerveja e a redução da formação da MeIQx. Neste contexto, apenas foi possível identificar estudos relacionados com a formação de aductos com o DNA no fígado e pulmões de rato, quando estes são alimentados com uma dieta rica em MeIQx, e o efeito redutor da formação de aductos com o DNA, quando os ratos são alimentados com a mesma dieta na presença de cerveja (Arimoto-Kobayashi *et al* 2005).

No que diz respeito à 4,8-DiMeIQx foram observadas diferenças significativas entre os níveis obtidos para a carne marinada com cerveja, vinho e amostras controlo ($p < 0.05$). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras controlo e amostras marinadas em vinho (Tukey test). Apenas a marinada em cerveja reduz significativamente os níveis de 4,8-DiMeIQx após 1, 2 e 4 horas de marinada. Na marinada de vinho, após uma e duas horas, verificou-se um aumento da quantidade de 4,8-DiMeIQx, mas este aumento não foi significativo. Após seis horas de marinada em vinho, as quantidades de 4,8-DiMeIQx nas amostras de carne foram semelhantes às

obtidas na marinada com cerveja, sendo os valores observados próximos do limite de detecção do método. Os resultados obtidos nas marinadas de vinho estão de acordo com os descritos por outros autores, que referem uma inibição da formação da 4,8-DiMeIQx superior a 87%, após marinar frango em vinho durante um intervalo de tempo longo (Busquets et al 2006).

As duas marinadas (cerveja e vinho tinto) reduzem significativamente a quantidade de A α C ($p < 0.05$), não sendo observadas diferenças significativas entre a quantidade de A α C obtida nas amostras de carne marinada com cerveja e com vinho (Tukey test). No entanto, foram encontradas diferenças significativas no que respeita à quantidade de A α C presente na carne marinada a tempos diferentes ($p = 0.007$).

Os valores obtidos da redução da quantidade de A α C oscilaram entre 7 e 77%. A correlação de Person indicou uma correlação negativa entre o tempo de marinada em cerveja e a concentração de A α C ($p = -0.659$, para um nível de significância 0.05), resultados semelhantes não foram obtidos para as marinadas de vinho. Na literatura não foram encontrados estudos relacionados com o efeito dos polifenóis na inibição da formação da A α C em carne grelhada. Contudo, ensaios de avaliação do efeito da vitamina C, α -tocoferol e BHT na formação das HAAs em peixe frito, evidenciaram que a inibição ou potenciação da quantidade de A α C depende do tipo e concentração de antioxidante (Tay *et al* 2001).

Os compostos Trp-P-1, Trp-P-2 e MeA α C foram identificados apenas em concentrações próximas do limite de detecção do método analítico, não sendo possível a sua avaliação estatística.

O tratamento estatístico global dos resultados foi realizado por análise de componentes principais (PCA), usando os teores de HAAs como variáveis, de forma a reduzir a dimensão dos dados, e evidenciar os efeitos mais importantes do tempo de marinada na formação das HAAs. Os resultados da PCA apresentam-se num gráfico bidimensional em função das componentes 1 e 2 (Figura 3.6), que explica 78,8% da variância dos resultados. O quadrante positivo deste gráfico para a componente 1 está relacionado com os níveis de PhIP, MeIQx e A α C, representando 53,9% da variância

O quadrante positivo do gráfico bidimensional para a componente 2 está relacionado com os níveis de 4,8-MeIQx, traduzindo 24,7% da variância dos resultados. No gráfico as HAAs usadas para a definição das componentes foram assinaladas nas margens, indicando a direcção em que os seus teores aumentam.

As amostras controlo apresentaram elevados níveis de PhIP, MeIQx e AaC, por sua vez, as amostras marinadas estão colocadas em diferentes posições do gráfico (Figura 3.6). Nesta análise verifica-se que as amostras marinadas em cerveja durante 1 e 2 horas diferem das amostras marinadas em vinho, com um tempo de marinada semelhante. Adicionalmente, foram observadas menores diferenças nas amostras marinadas em vinho e em cerveja durante 4 e 6 horas.

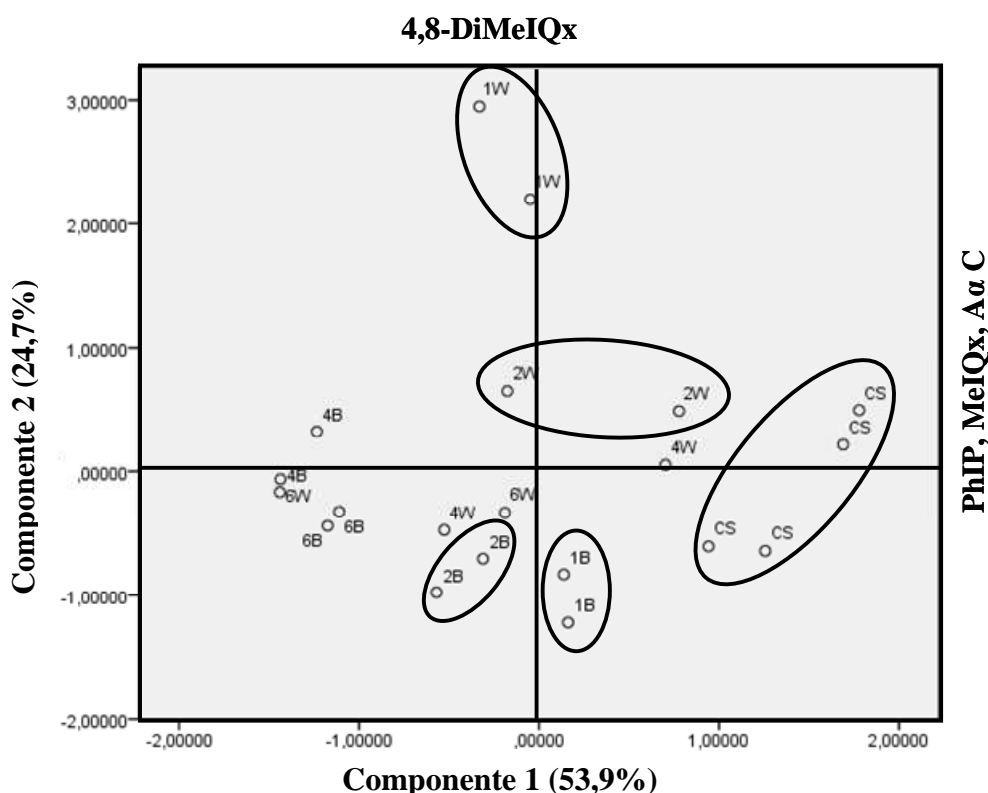


Figura 3.6: Gráfico bidimensional representando a análise de componentes principais dos dados das HAAs. CS – amostra controlo; 1B – Amostras de bife grelhado e marinado com cerveja durante 1 hora; 2B – Amostras de bife grelhado e marinado com cerveja durante 2 horas; 4B – Amostras de bife grelhado e marinado com cerveja durante 4 horas; 6B – Amostras de bife grelhado e marinado com cerveja durante 6 horas; 1W – Amostras de bife grelhado e marinado com vinho durante 1 hora; 2W – Amostras de bife grelhado e marinado com vinho durante 2 horas; 4W – Amostras de bife grelhado e marinado com vinho durante 4 horas; 6W – Amostras de bife grelhado e marinado com vinho durante 6 horas.

3.2.1.2 Características sensoriais do bife grelhado marinado em vinho e em cerveja

A análise sensorial, segundo o IFT (Institute of Food Technology), é uma disciplina científica usada para invocar, medir, analisar e interpretar as reacções características dos alimentos que são percebidas pelos sentidos da visão, da audição, do olfacto, do gosto e do tacto

Nos laboratórios de análise sensorial tem sido verificado uma crescente exigência em mostrar que os resultados fornecidos são reprodutíveis com os obtidos por outros laboratórios. Neste sentido, no presente trabalho houve a necessidade de utilizar dois painéis sensoriais diferentes. Os resultados obtidos durante as sessões de treino foram comparados, sendo que após quatro sessões de treino não foram observadas diferenças significativas nos resultados dos dois painéis. Adicionalmente, as conclusões gerais das análises efectuadas foram muito semelhantes para os dois painéis.

A análise sensorial foi realizada em amostras controlo grelhadas e em amostras sujeitas a 2h de marinada em vinho e em cerveja. A análise sensorial em amostras sujeitas a 4 e 6h de marinada não foram efectuadas, uma vez que estas apresentavam um aroma desagradável a vinho, uma cor vermelha muito intensa e uma fraca aparência geral.

A análise da variância indicou diferenças significativas ($p < 0,05$) em alguns atributos considerados para amostras controlo (não marinadas) e amostras sujeitas a marinadas de cerveja e vinho (2 horas). Em geral, os dados correspondentes a cada atributo foram simétricos e mesocúrticos. No que se refere às características sensoriais odor estranho, ácido, amargo e suculência não se verificaram diferenças significativas. Contudo, foram notadas diferenças significativas para todos os outros atributos (intensidade do odor, odor a carne, cor vermelha/castanha, aparência geral, aroma a vinho, aroma a cerveja, adstringência, aroma estranho, aroma residual e qualidade global). Os resultados médios, obtidos a partir dos dois painéis para os 14 atributos sensoriais, nas amostras de carne grelhada (controlo e marinadas em vinho e cerveja) estão representados na Figura 3.7.

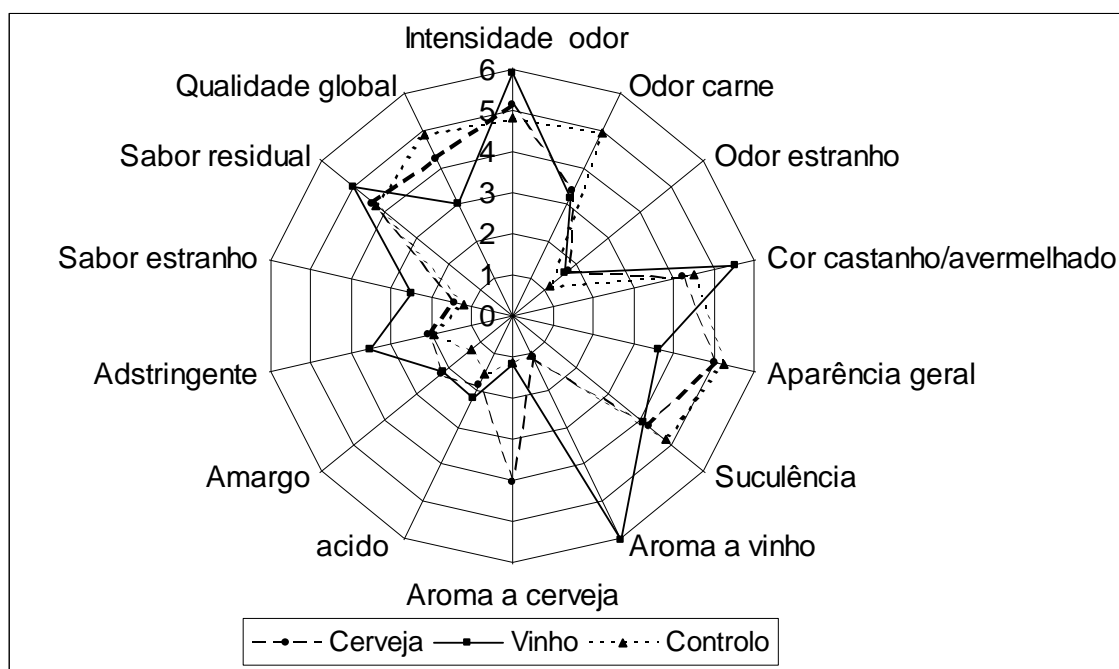


Figura 3.7: Resultados médios para os 14 atributos sensoriais nas amostras de carne grelhada (controle, marinada em cerveja e marinada em vinho).

Os bifes controle apresentaram um maior odor a carne e uma maior qualidade global, quando comparados com os bifes marinados em cerveja e vinho. No que diz respeito à cor vermelho/acastanhado, à qualidade e aparência global, à adstringência e aroma estranho Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0.05$) entre bife grelhado marinado em cerveja e as amostras controle. Os bifes marinados em cerveja apresentaram diferenças significativas para o aroma a cerveja ($p > 0.05$).

Em relação aos bifes grelhados marinados em vinho verificaram-se diferenças significativas relativamente às amostras controle (teste Tukey) para a cor vermelho/acastanhado, aroma a vinho, adstringência e aroma residual. Os bifes marinados em vinho apresentaram valores mais elevados para estes parâmetros e menores para a aparência global e qualidade global ($p > 0.05$).

As amostras marinadas em cerveja apresentam características sensoriais mais parecidas com as amostras controle do que as amostras marinadas em vinho tinto.

3.3 – SPME-HPLC/DAD/FLD DAS HAAS APOLARES E DA PHIP

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de extração livre de solventes, que tem sido utilizada principalmente associada a GC. Mais recentemente, para alargar a sua aplicação a compostos não-voláteis e termicamente instáveis, SPME tem sido associada a HPLC. No entanto, o número de aplicações de SPME-HPLC ainda é muito reduzido quando comparado com o de SPME-GC. Um crescente interesse nesta técnica tem sido verificado, porque é mais rápida do que as técnicas de extração convencionais. A determinação de HAAs apolares (Trp-P1, A α C, MeA α C e PhIP) foi realizada em extractos de carne por SPME-HPLC/FLD após optimização das condições de extração, incluindo, selecção da fibra, solventes e tempos de extração (Cárdenes *et al.* 2004; Martín-Calero *et al.* 2006; Cárdenes *et al.* 2006). Esta metodologia foi testada para a análise de carne grelhada (amostras controlo da secção 4.2.1), sendo os resultados, comparados com os obtidos anteriormente pelo método de Gross modificado.

As condições apropriadas para a solubilização das HAAs em extractos de carne, antes da fase de extração por SPME foram optimizadas, atendendo a que para amostras sólidas é necessário efectuar a solubilização prévia num solvente adequado. Deste modo, foram efectuadas alterações nas condições de centrifugação, aumentando o tempo e o número de rotações por minuto.

Na Figura 3.8 está representado um cromatograma típico obtido para uma mistura de padrões com concentração 100 ng/mL. A linearidade do método de SPME para a PhIP, a Trp-P-1, a A α C e a MeA α C foi avaliada para os intervalos de concentração indicados na Tabela 3.7. As curvas de calibração obtidas apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,9960 para todos os compostos. Os limites de detecção variaram entre 0.106 e 0.005 ng/mL (Tabela 3.7)

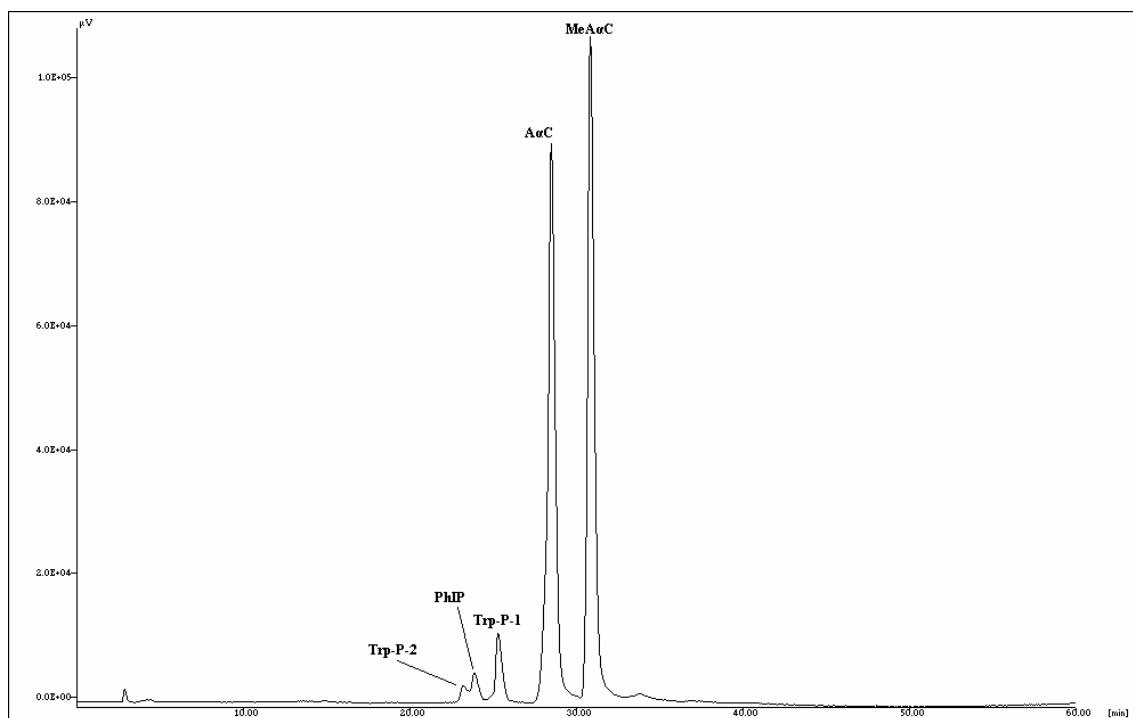


Figura 3.8: Cromatograma típico de uma injeção por SPME, de uma mistura de padrões de HAAs, com uma concentração de 100 ng/mL e detecção por fluorescência (λ de 307 nm de excitação e de emissão de 370 nm).

Tabela 3.7: Parâmetros das curvas de calibração e limites de detecção, avaliados pelo método do padrão externo, para λ de 307 nm de excitação e de emissão de 370 nm.

Composto	Intervalo de Concentração (ng/mL)	Declive (área units/ng)	r	Limite de detecção (ng)
PhIP	0,6 – 25	4623,7	0,9994	0,1060
Trp-P-1	0,6 – 25	9514,5	0,9980	0,0051
AαC	0,6 – 25	86968	0,9986	0,0054
MeAαC	0,6 – 25	90684	0,9983	0,0500

A PhIP e outras HAAs apolares foram determinadas em carne grelhada pelo método de adições de padrão. Na Figura 3.9 estão representados três cromatogramas típicos, um do extracto de carne não fortificado e dois de extractos fortificados. Os cromatogramas obtidos revelam poucas interferências dos componentes da matriz nos picos cromatográficos de interesse. A determinação das HAAs foi possível em extractos de carne ao nível de ng/g. Na Tabela 3.8 é apresentada uma comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos de extracção.

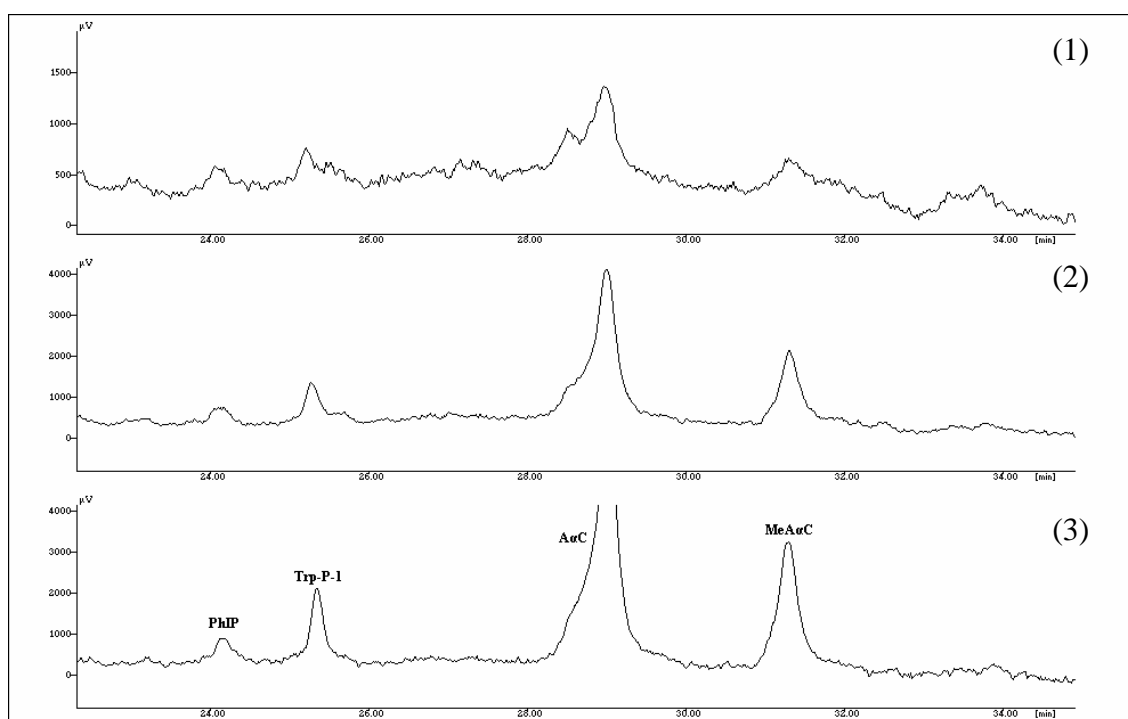


Figura 3.9: Cromatogramas típicos de injeção por SPME das diferentes HAAs apolares e da PhIP nas amostras de carne grelhada, com detecção por FLD (Ex. 307 nm e Em 370 nm). (1) não fortificado, (2) fortificado; com 10 ng/g para Trp-P-1, PhIP, AαC e MeAαC; (3); e com 20 ng/g para Trp-P-1, PhIP, AαC e MeAαC.

Tabela 3.8: Concentração (ng/g) das HAAs apolares e PhIP em carne grelhada, extraídas por SPME e SPE

HAAs	Extracção por SPME Concentração ng/g	Extracção por SPE Concentração ng/g
PhIP	20,9±0,58 ^b	33.8±5.5 ^a
Trp-P-1	Det/ não quantificado	Det/ não quantificado
AαC	17,8±2,62 ^a	19,0±2,44 ^a
MeAαC	Det/ não quantificado	Det/ não quantificado

^{a,b} - letras diferentes nas concentrações de HAAs indicam diferenças significativas entre os dois métodos quando aplicado o test-t ($p < 0,05$)

O método de SPME apresenta vantagens significativas relativamente ao método de SPE, pois é mais económico, e combina rapidez sensibilidade. Os limites de deteção obtidos para ambos os métodos foram semelhantes, apresentados anteriormente na Tabela 3.6 e 3.7, não se verificando também diferenças significativas nas concentrações de AαC. No entanto, no que refere à concentração da PhIP verifica-se diferenças significativas para os dois métodos. Quando foi utilizado um método de extracção por SPME, os valores de concentração de PhIP obtidos foram mais baixos, relativamente à outra técnica utilizada. Este facto indica que o método por SPME ainda necessita de ser melhorado.

4 – CONCLUSÕES

Os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho constituem uma boa estratégia para a determinação e quantificação das HAAs em amostras de carne processada de várias formas e com níveis de cocção diferentes.

O método de Gross modificado é mais dispendioso e moroso que o método de Toribio *et al.* (2007), no entanto, foi seleccionado para efectuar as análises de amostras de carne neste estudo, porque envolve menos perdas e permite a obtenção de percentagens de recuperação mais elevadas. Adicionalmente, este método é utilizado como método de referência em ensaios interlaboratoriais, permitindo obter resultados fiáveis e comparáveis com os da literatura.

No estudo comparativo do SPME com SPE não se verificaram diferenças significativas nas concentrações de HAAs, obtidas nas amostras de carne grelhada, excepto para a PhIP. Para além disso, é importante referir que a utilização do método de SPME é apenas viável para a extracção das HAAs apolares e da PhIP. Este facto, demonstra algumas limitações em relação ao método de Gross modificado, o que indica que o método de SPME ainda necessita de ser melhorado. No entanto, o método de SPME é mais económico que o de SPE, e combina rapidez e sensibilidade, com limites de detecção semelhantes.

Neste trabalho também foi comprovado que a utilização simultânea de um detector de fluorescência e Díodos permite baixar os limites de detecção na análise das HAAs apolares e da PhIP, pois estas apresentam fluorescência em solventes apolares. Este sistema HPLC/DAD/FLD torna-se vantajoso quando o objectivo é identificar e quantificar a presença de HAAs em quantidades da ordem do nanograma por grama.

A eficiência analítica da extracção das HAAs é sempre menor que 100%, deste modo, as quantidades detectadas têm que ser corrigidas devido às baixas recuperações conseguidas. A utilização de um único padrão interno não é o ideal porque as HAAs incluem diferentes classes de compostos, que se verificou serem extraídos com diferentes graus de eficiência. O método da adição de padrões é o mais adequado para quantificar as HAAs, permitindo que a recuperação de cada HAA seja realizada individualmente.

O perfil de HAAs identificadas e quantificadas variou com o tipo de processamento da amostra. As amostras de carne assada apresentaram uma maior

quantidade de HAAs apolares (Me α C, Trp-P-1 e Trp-P-2), não sendo detectadas HAAs do tipo IQ. Na carne frita e grelhada obtiveram-se maiores teores de PhIP, MeIQx e IQ. È importante referir que as HAAs só foram quantificáveis para um nível de cocção “bem passado”.

No seguimento dos objectivos deste trabalho foi verificado que a introdução de alterações nos hábitos culinários permite que os ingredientes possam actuar não só no flavour como também na protecção contra a formação de HAAs. Assim, ao avaliar a influência de marinadas de cerveja e de vinho na formação de HAAs, nas amostras de carne grelhada, verificou-se uma redução significativa destas. No entanto, para tempos de marinada mais curtos, a cerveja revelou ser mais eficiente na redução das HAAs do que o vinho. Adicionalmente, a marinada de cerveja não influenciou as características de aparência e sabor do bife grelhado. A utilização das marinadas permite diminuir a exposição dos consumidores a compostos potencialmente e ou provavelmente carcinogénicos.

5 – BIBLIOGRAFIA

- Alaejos M.S.; Ayala J.H.; González V.; Afonso A.M. Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *J Chromatogr. B*, 862, 2008, 15-42.
- Alexander J., Reistad R., Hegstad S., Frandsen H., Ingebrigtsen K., Paulsen J.E., Becher G., "Biomarkers of exposure to heterocyclic amines: approaches to improve the exposure assessment", *Food Chem. Toxicol.*, 40, 2002, 1131 – 1137.
- Augustsson K.A., Skog K., Jägerstad M., Dickman P.W., Steineck G., Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet*, 353, 1999, 703 – 707.
- Balogh Z.; Gray J.I.; Gomaa E.A.; Booren A.M. Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food Chem. Toxicol.*, 38, 2000, 395-401.
- Bang J., Frandsen H., Skog K. Blue Chitin Columns for the Extraction of Heterocyclic Amines from Urine Samples. *Chromatographia*, 60, 2004, 651–655.
- Bang J., Nukaya H., Skog K., Blue Chitin columns for the extraction of heterocyclic amines from cooked meat, *J. Chromatogr. A*, 977, 2002, 97–105.
- Baranczewski, P.; Gustafsson, J.A.; Moller, L. DNA adduct formation of 14 heterocyclic aromatic amines in mouse tissue after oral administration and characterization of the DNA adduct formed by 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AαC), analysed by P-HPLC. *Biomarkers* 9(3), 2004, 243-257.
- Barceló-Barrachina E., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., Evaluation of different liquid chromatography–electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines, *J. Chromatogr. A*, 1023, 2004, 67–78, a.
- Barceló-Barrachina E., Moyano E., Galceran M.T., Determination of heterocyclic amines by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1054, 2004, 409–418, b.
- Barceló-Barrachina E., Santos F.J., Puignou L., Galceran M.T., Comparison of dimethylformamide dialkylacetal derivatization reagents for the analysis of heterocyclic amines in meat extracts by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 545, 2005, 209 – 217.
- Barceló-Barrachina E., Moyano E., Galceran M.T., Lliberia, J.L., Bag B. and Cortes M.A., Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of heterocyclic amines in food. *J. Chromatogr. A*, 1125, 2006, 195 – 203.
- Bermudo, E., Ruiz-Calero, V., Puignou, L. and Galceran, M.T., Analysis of heterocyclic amines in chicken by liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta*, 536, 2005, 83 – 90.

- Britt,C., Gomaa,E.A., Gray,J.I. and Booren,A.M.; Influence of cherry tissue on lipid oxidation and heterocyclic amine formation in ground beef patties. J. Agric. Food Chem., 46, 1998, 4891-4897.
- Bordas M., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., Formation and stability of heterocyclic amines in a meat flavour model system Effect of temperature, time and precursors. J. Chromatogr. B, 802, 2004, 11 – 17.
- Borgen, E. and Skog, K., Heterocyclic amines in some Swedish cooked foods industrially prepared or from fast food outlets and restaurants. Mol. Nutr. Food Res., 48, 2004, 292 – 298.
- Britt C.; Gomaa E.A.; Gray J.I.; Booren A.M. Influence of cherry tissue on lipid oxidation and heterocyclic aromatic amine formation in ground beef patties. J Agric Food Chem 46, 1998, 4891-4897.
- Busquets R., Bordas M., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. J. Chromatogr. B, 802, 2004, 79 – 86.
- Busquets, R.; Puignou, L.; Galceran, M.T.; Skog, K. Effect of red wine marinades on the formation of heterocyclic amines in fried chicken breast. J Agric. Food Chem., 54, 2006, 8376-8384.
- Butler, L.M.; Sinha, R.; Millikan, R.C.; Martin, C.F.; Newman, B.; Gammon, M.D.; Ammerman, A.S.; Sandler, R.S. Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. Am. J. Epidemiol., 157, 2003, 434-445.
- Cárdenes, L.; Martín-Calero, A.; Ayala, J.H.; González, V.; Afonso, A.M. Experimental design optimization of solid-phase microextraction conditions for the determination of heterocyclic aromatic amines by high-performance liquid chromatography. Anal. Lett., 39, 2006, 405-423.
- Casal S., Mendes E., Fernandes J.O., Oliveira M.B.P.P., Ferreira M.A. Analysis of heterocyclic aromatic amines in foods by gas chromatography–mass spectrometry as their *tert*.-butyldimethylsilyl derivatives. J. Chromatogr. A, 1040, 2004, 105–114.
- Cross, A.J. and Sinha, R., Meat-Related Mutagens/Carcinogens in the Etiology of Colorectal Cancer. Environ. Mol. Mutagen., 44, 2004, 44–55.
- Dabrowski, W.M. e Sikorski, Z.E. (eds), “Toxins in Food”. London. CRC Press Taylor & Francis, 2004.
- Dashwood, R.H. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an ‘A-to-Z’ guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. Mutation Research, 2002, 511, 89-112
- Felton J.S., Knize M.G., Salmon C.P., Malfatti M.A. and Kulp K.S., Human Exposure to Heterocyclic Amine Food Mutagens/Carcinogens: Relevance to Breast Cancer. Environ. Mol. Mutagen., 39, 2002, 112 – 118.
- Felton, J.S., Knize M.G., Bennett L.M., Malfatti M.A., Colvin M.E and Kulp K.S., Impact of environmental exposures on the mutagenicity/carcinogenicity of heterocyclic amines. Toxicology, 198, 2004, 135–145.

- Felton, J.S., Knize M.G., Hatch, F.T., Tanga M.T. and Colvin M.E., Heterocyclic amine formation and the impact of structure on their mutagenicity. *Cancer Lett.*, 143, 1999, 127 – 134.
- Felton, J.S., Malfatti M.A., Knize, M.G., Salmon C.P., Hopmans E.C. and Wu R.W., Health risks of heterocyclic amines. *Mutat. Res.*, 376, 1997, 31 – 41.
- Frederiksen, H., Two food-borne heterocyclic amines: Metabolism and DNA adduct formation of amino-a-carbolines. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 2005, 263 – 273.
- Galceran M.T., Moyano E., Puignou L., Pais P., Determination of heterocyclic amines by pneumatically assisted electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 730, 1996, 185-194, a.
- Galceran, M.T.; Pais, P.; Puignou, L. Isolation by solid-phase extraction and liquid chromatographic determination of mutagenic amines in beef extrac. *J. Chromatogr. A*, 1996, 719, 203-212 b.
- Gibis, M. Effect of oil marinades with garlic, onion and lemon juice on the formation of heterocyclic aromatic amines in fried beef patties. *J. Agric. Food. Chem.*, 55, 2007, 10240-10247.
- Gooderham N.J., Murray S., Lynch A.M., Edwards, R.J.; Yadollahi-Farsani M., Bratt, C.; Rich K., Zhao K., Murray, B.P.; Bhadresa, S.; Crosbie, S.J.; Boobis A.R., Davies D.S., Heterocyclic amines: evaluation of their role in diet associated human cancer. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 42, 1996, 91-98.
- Gooderham N.J., Murray S., Lynch A.M., Yadollahi-Farsani M., Zhao K., Rich K., Boobis A.R., Davies D.S. Assessing human risk t heterocyclic amines. *Mutat. Res.* 376, 1997, 53 – 60.
- Gross, G.A. e Grüter, A., Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food products. *J. Cromatogr.*, 592, 1992, 271-278.
- Gross, G.A. Simple methods for quantifying mutagenic heterocyclic aromatic amines in food products. *Carcinogenesis*, 11, 1990, 1597- 1603.
- Hayatsu H, Hayatsu T, Arimoto S, Sakamoto H. A Short-Column Technique for Concentrating Mutagens/ Carcinogens Having Polycyclic Structures. *Anal. Biochem.*, 235, 1996, 185 – 190.
- Hirose M., Nishikawa A., Shibutani M., Imai T. and Shirai T., “Chemoprevention of Heterocyclic Amine-Induced Mammary Carcinogenesis in Rats”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 39, 2002, 271 – 278.
- Holder, C. L., Preece, S. W., Conway, S. C., Pu, Y. and Doerge, D. R., Quantification of Heterocyclic Amine Carcinogens in Cooked Meats Using Isotope Dilution Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 11, 1997, 1667 – 1672.
- Hui Y.H., Nip W., Rogers R. e Young O.A, “Meat Science and Applications”. New York. Marcel Dekker, Inc., 2001
- Jägerstad M. e Skog K., Genotoxicity of heat-processed food. *Mutat. Res.*, 574, 2005, 156 – 157.

- Johansson M.; Jägerstad M. Influence of pro- and antioxidants on the formation of mutagenic-carcinogenic heterocyclic amines in a model system. *Food Chem.*, 56, 1996, 69-75.
- Jägerstad M.; Skog K.; Arvidsson P.; Solyakov A. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 207, 1998, 419-427.
- Johansson M.; Fredholm L.; Bjerne L.; Jägerstad M. Influence of frying fat on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers and pan residues. *Food Chem. Toxicol.*, 33, 1995, 993-1004.
- Karamanos, N.K.; Tsegenidis, T.; Analysis of carcinogenic heterocyclic amines by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 19, 1996, 2247-2256.
- Kataoka H. Methods for the determination of mutagenic heterocyclic amines and their applications in environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, 774, 1997, 121 – 142 a.
- Kataoka H., Kijima K., Analysis of heterocyclic amines as their N-dimethylaminomethylene derivatives by gas chromatography with nitrogen-phosphorus. *J. Chromatogr. A*, 767, 1997, 187 - 194 b.
- Kato T.; Hiramoto K.; Kikugawa K. Mutagenicity of cooked hamburger is reduced by addition of ascorbate and erythorbate to ground beef. *J. Health Sci.*, 46, 2000, 389 - 392.
- Keating G.A., Layton D.W., Felton J.S., Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutat. Res.*, 443, 1999, 149 – 156.
- Keating, G.A. and Bogen, K. T., “Estimates of heterocyclic amines in the US population”, *J. Chromatogr.* 802, 2004, 127 – 133.
- Keating, G.A. and Bogen, K. T., Methods for estimating heterocyclic amine concentrations in cooked meats in the US diet. *Food Chem. Toxicol.*, 39, 2001, 29 – 43.
- Kikugawa K. Prevention of mutagen formation in heated meats and model systems. *Mutagenesis* 19, 2004, 431-439.
- Knize, M.G., Sinha, R., Rothman, N., Brown, E.D., Salmon, C.P., Levander, A., Cunningham, P.L. and Felton J.S., Heterocyclic Amine Content in Fast-food Meat Products. *Fd Chem. Toxic.*, 33, 1995, 545-551.
- Knize, M.G., Salmon, C.P., Hopmans, E.L. and Felton, J.S., Analysis of foods for heterocyclic aromatic amine carcinogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 763, 1997, 179 – 185.
- Knize, M.G., Felton J.S. Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat. *Nut. Rev.*, 63, 2005, 158-165.
- Kummrow, F.; Umbuzeiro, G.A. Uso de Blue rayon para extração/concentração de compostos policíclicos em amostras ambientais. *Quim Nova*, 29, 2006, 528-534.

- Lan, C.M.; Kao, T.H.; Chen, B.H. Effects of heating time and antioxidants on the formation of heterocyclic amines in marinated foods. *J Chromatogr., B* 802, 2004, 27-37.
- Lynch A.M., Murray S., Gooderham, N.G. and Boobis A.R., Exposure to and activation of dietary heterocyclic amines in humans. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, 21, 1995, 19-31.
- Martín-Calero A.; Ayala J.H.; González V.; Afonso A.M. Determination of less polar heterocyclic amines in meat extracts Fast sample preparation method using solid-phase microextraction prior to high-performance liquid chromatography-fluorescence quantification. *Anal Chim Acta*, 582, 2007, 259–266.
- Monti S.M.; Ritieni A.; Sacchi R.; Skog K.; Borgen E.; Fogliano V. Characterization of phenolic compounds in virgin olive oil and their effect on the formation of carcinogenic/mutagenic heterocyclic amines and in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2001, 3969-3975.
- Murkovic M., Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic aromatic amines in fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106, 2004, 777 – 785.
- Murkovic M. Analysis of heterocyclic aromatic amines. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 2007, 139-146.
- Murkovic, M.; Steinberger, D; Pfannhauser, W. Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Z. Lebensm. Unters Forsch A*, 207, 1998, 477-480.
- Nagao M., Ushijima T., Watanabe N., Okochi E., Ochiai M., Nakagama H. and Sugimura T., Studies on Mammary Carcinogenesis Induced by a Heterocyclic Amine, 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, in Mice and Rats. *Environ. Mol. Mutagen.*, 39, 2002, 158 – 164.
- Nerurkar P.V, Lemarchand, L., Cooney, R., Effects of marinating with asian marinades or western barbecue sauce on PhIP and MeIQx formation in barbecued beef. *Nutr. Cancer*, 34, 1999, 147-152.
- Novak M., Rajagopal S., Xu L., Kazerani S., Toth K., Brooks M. and Nguyen T., Chemistry of carcinogenic and mutagenic metabolites of heterocyclic aromatic amines. *J. Phys. Org. Chem.*, 17, pp: 615–624, 2004
- Oguri A., Suda M., Totsuka Y., Sugimura T., Wakabayashi K., Inhibitory effects of antioxidants on formation of heterocyclic amines. *Mutat. Res.*, 402, 1998, 237 – 245.
- Pais, P.; Salmon, C.P.; Knize, M.G.; Felton, J.S. Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats and meat drippings. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1999, 1098-1108.
- Pais P.; Knize M.G. Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *J Chromatog B*, 747, 2000, 139-169.
- Persson, E.; Graziani, G.; Ferracane, R.; Foligiano, V.; Skog, K. Influence of antioxidants in virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers. *Food Chem. Toxicol.*, 41, 2003, 1587-1597.
- Persson E.; Sjoeholm I.; Nyman M. Skog K. Addition of various carbohydrates to beef burgers affects the formation of heterocyclic amines during frying. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2004, 7561-7566.

- Puignou L.; Casal J.; Santos F. J.; Galceran M. T. Determination of heterocyclic aromatic amines by capillary zone electrophoresis in a meat extract. *J. Chromatogr. A*, 769, 1997, 293-299.
- Reineccius R (ed), "Flavor Chemistry and Technology, Second Edition". New York, CRC Press Taylor & Francis, 2006.
- Richiling, E.; Decker, C.; Haring, D.; Herderich, M.; Schreier, P. Analysis of heterocyclic aromatic amines in wine by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 791, 1997, 71-77.
- Ristic A.; Cichna M.; Sontag G. Determination of less polar heterocyclic aromatic amines in standardised beef extracts and cooked meat consumed in Austria by liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 802, 2004, 87-94.
- Salmon, C.P.; Knize, M.G.; Felton J.S. Amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food Chem Toxicol.*, 35, 1997, 433-441
- Salmon, C.P.; Knize, M.G.; Felton, J.S.; Zhao, B.; Seow, A. Heterocyclic aromatic amines in domestically prepared chicken and fish from Singapore Chinese households. *Food Chem. Toxicol.*, 44, 2006, 484-489.
- Salmon, C.P.; Knize, M.G.; Panteleakos, F.N.; Wu, R.W.; Nelson, D.O.; Felton J.S. Minimization of heterocyclic amines and thermal inactivation of *Escherichia coli* in fried ground beef. *J Nat. Câncer Inst.*, 92, 2000, 1773-1778.
- Santos F.J., Barceló-Barrachina E., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., Persson E., Skog K., Messner C., Murkovic M., Nabinger U., Ristic A.. Analysis of heterocyclic amines in food products: interlaboratory studies. *J. Chromatogr. B*, 802, 2004, 69–78.
- Shin H.S.; Rodgers W.J.; Gomaa E.A.; Strasburg G.M.; Gray J.I. Inhibition of heterocyclic aromatic amine formation in fried ground beef patties by garlic acid and selected garlic-related sulfur compounds. *J. Food Prot.*, 65, 2002 1766-1770 a.
- Shin H.S.; Rodgers W.J.; Strasburg G.M.; Gray J.I. Reduction of heterocyclic amine formation and overall mutagenicity in fried beef patties by organosulfur compounds. *J. Food Sci.*, 67, 2002 3304-3308 b.
- Shin H.S.; Strasburg G.M.; Ustunol Z. Influence of different unifloral honeys on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried ground beef patties. *J. Food Sci.*, 68, 2003, 810-815.
- Sinha R., An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. *Mutat. Res.*, 506, 2002, 197 – 204.
- Sinha R., Rothman N., "Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines in the etiology of human cancer" *Cancer Lett.*, 143, 1999, 189-194.
- Sinha R., Rothman N., Salmon, C.P.; Knize, M.G.; Brown, E.D.; Swanson, C.A; Rhodes, D.; Rossi, S.; Felton, J.S.; Levander, O.A. Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to

- varying degrees of doneness and gravy made from meat drippings. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 1998, 279-287.
- Skog K., Augustsson K., Steineck G., Stenberg M. and Jägerstad M., Polar and Non-polar Heterocyclic Amines in, Cooked Fish and Meat Products and their Corresponding Pan Residues. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 1997, 555 – 565.
- Skog K.I., Johansson M.A.E. and Jägerstad M.I., Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 1998, 879 - 896.
- Skog, K. and Solyakov A., Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food Chem. Toxicol.*, 40, 2002, 1213 – 1221.
- Skog, K., Solyakov, A., Jagerstad, M., Effects of heating conditions and additives on the formation of heterocyclic amines with reference to amino-carbolines in a meat juice model system. *Food Chem.*, 68, 2000, 299 - 308.
- Skog, K.; Johansson, M.A.; Jagerstad, M; Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 1998, 879-896.
- Skog, K. Blue cotton, Blue Rayon and Blue Chitin in the analysis of heterocyclic aromatic amines-a review. *J. Chromatogr. B*, 802, 2004, 39–44.
- Snyderwine, E. G., “Food-derived Heterocyclic Amines as Etiologic Agents in Human Mammary Cancer”, *Cancer Supplement*, 74, 1994, 1070 – 1077.
- Solyakov, A., Skog, K. and Jagerstad, M., Heterocyclic Amines in Process Flavours, Process Flavour Ingredients, Bouillon Concentrates and a Pan Residue. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 1999, 1 – 11.
- Solyakov, A., Skog, K. Screening for heterocyclic amines in chicken cooked in various ways. *Food Chem. Toxicol.*, 40, 2002, 1205-1211.
- Sugimura T., Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutat. Res.*, 376, 1997, 211 – 219.
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H. and Nagao M., Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.*, 95, 2004, 290 – 299.
- Tikkanen L.M., Latva-Kala K.J., Heinio R.L. Effects of commercial marinades on the mutagenic activity, sensory quality and amount of heterocyclic amines in chicken grilled under different conditions. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 1996, 725-730.
- Toribio, F.; Puignou, L.; Galceran, M.T. Separation of heterocyclic aromatic amines in food products. *J. Chromatogr. B*, 747, 2000, 171-202.
- Toribio F., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., Ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of heterocyclic amines in food. *J. of Chromatogr. A*, 948, 2002, 267–281.

- Toribio, F.; Busquets, R.; Puignon, L.; Galceran, M.T. Heterocyclic amines in griddled beef steak analysed using a single extract clean-up procedure. *Food Chem. Toxicol.*, 45, 2007, 667-675.
- Tsai S.J.; Jenq S.N.; Lee H. Naturally occurring diallyl disulfide inhibits the formation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in boiled pork juice. *Mutagenesis*, 11, 1996, 235-240.
- Turesky R.J. Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis and carcinogenesis. *Drug Metabol Rev*, 34(3), 2002, 625-650.
- Turesky R.J.; Vouros, P.; Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts in vitro and in vivo. *J Chromatogr. B*, 802, 2004, 155-166.
- Turesky, R.J., Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 2005, 101 – 117.
- Vitaglione P.; Fogliano V. Use of antioxidants to minimize the human health risk associated to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in food. *J. Chromatogr. B*, 802, 2004, 189 – 199.
- Vitaglione P.; Monti S.M.; Ambrosino P.; Skog K.; Fogliano V. Carotenoids from tomatoes inhibit heterocyclic amine formation. *Eur. Food Res. Technol.*, 215, 2002, 108-113.
- Voskuil, D.W.; Augustsson, K.; Dickman, P.W.; Veer, P.; Steineck, G. Assessing the human intake of heterocyclic amines: limited loss of information using reduced sets of questions. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 8, 1999, 809-814.
- Wakabayashi, Keiji; Sugimura, Takashi; Heterocyclic amines formed in the diet: Carcinogenicity and its modulation by dietary factors. *J. Nutr. Biochem*, 1998, 9, 604-612.
- Warzecha, L.; Janoszka, B.; Blaszczyk, U.; Strozyk, M.; Bodzek, D.; Dobosz, C. Determination of heterocyclic aromatic amines (HAs) content in samples of household-prepared meat dishes. *J Chromatogr. B*, 802, 2004, 95-106.
- Weisburger J.H. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutat. Res.*, 506, 2002, 9–20.
- Weisburger, J.H.; Nagao, M.; Wakabayashi, K.; Oguri, A. Prevention of heterocyclic amine formation by tea and tea polyphenols. *Cancer Lett*, 83, 1994, 143-147.
- Weisburger, J.H.; Veliath, E.; Larios, E.; Pittman, B.; Zang, E.; Hara. Y. Tea polyphenols inhibit the formation of mutagens during the cooking of meat. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.*, 516, 2002, 19-22.
- Wu J., Wong M.K., Li S.F.Y., Lee H.K. and Ong C.N., Combination of orthogonal array design and overlapping resolution mapping for optimizing the separation of heterocyclic amines by capillary zone electrophoresis *J. Chromatogr. A*, 709, 1995, 351-359.
- Xue W., Warshawsky D., Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology Appl. Pharm.*, 206, 2005, 73 – 93.

Zambonin C. G.; “Coupling solid-phase microextraction to liquid chromatography. A review”; Anal. Bioanal. Chem., 375, 2003,73–80.